

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



*И.И. Мечников*

Том 40  
2019

6

Volume 40, Number 6, 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, Biological Abstracts, Chemical Abstracts,  
Ulrich's International Periodicals Directory, International Nuclear Information System (INIS Atomindex),  
Excerpta Medica, Russian Science Citation Index (на платформе Web of Science), elibrary

**Главный редактор**  
**академик РАН Хаитов Рахим Мусаевич**



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

- Акдис Ч.**, MD, профессор (Давос, Швейцария)  
**Агаче И.**, MD, профессор (Брашов, Румыния)  
**Атауллаханов Р.И.**, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)  
**Болдырева М.Н.**, доктор мед. наук (Москва, Россия)  
**Валента Р.**, MD, профессор (Вена, Австрия)  
**Гариб 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)  
**Емельянов А.В.**, доктор мед. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
**Ильина Н.И.**, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)  
**Кадагидзе З.Г.**, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)  
**Караулов А.В.**, академик РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)  
**Мураро А.**, MD, профессор (Падуя, Италия)  
**Пащенко 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)  
**Сизякина Л.П.**, доктор мед. наук, профессор (Ростов-на-Дону, Россия)  
**Симбирцев А.С.**, член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор  
(Санкт-Петербург, Россия)  
**Филатов А.В.**, доктор биол. наук, профессор (Москва, Россия)  
**Фрейдлин И.С.**, член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор  
(Санкт-Петербург, Россия)  
**Хаитов М.Р.**, член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)  
**Шиловский И.П.**, доктор биол. наук (Москва, Россия)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

- Карамов Э.В.**, доктор биол. наук, профессор (Москва, Россия)  
**Козлов В.А.**, академик РАН, доктор мед. наук, профессор  
(Новосибирск, Россия)  
**Медуницын Н.В.**, академик РАН, доктор мед. наук, профессор(Москва, Россия)  
**Николаева И.А.**, доктор биол. наук (Москва, Россия)  
**Сотникова Н.Ю.**, доктор мед. наук, профессор (Иваново, 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)  
**Потапнев М.П.**, доктор мед. наук, профессор (Минск, Беларусь)  
**Титов Л.П.**, доктор мед. наук, профессор (Минск, Беларусь)

Научно-практический рецензируемый журнал  
«Иммунология»  
Том 40, № 6, 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,  
editorial@immunologiya-journal.ru  
(для корреспонденции)

Журнал распространяется по подписке.  
Подписка через Интернет: [www.aks.ru](http://www.aks.ru); [www.pressa-rf.ru](http://www.pressa-rf.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](http://www.geotar.ru)

Верстка: Килимник А.И.  
Корректор: Макеева Е.И.  
Выпускающий редактор: Исаева А.В.,  
[isaeva@geotar.ru](mailto:isaeva@geotar.ru)  
Отдел рекламы: Туралина О.А.,  
[turalina@geotar.ru](mailto:turalina@geotar.ru)

Подписано в печать 15.12.2019.  
Тираж 3000 экземпляров.  
Формат 60 × 90 1/8.  
Печать офсетная. Печ. л. 10.

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

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, Biological Abstracts,  
Chemical Abstracts, Excerpta Medica,  
Ulrich's International Periodicals Directory,  
International Nuclear Information System  
(INIS Atomindex),  
Russian Science Citation Index  
(no the Web of Science platform), elibrary

## Editor-in-Chief

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

---

## Immunologiya

Volume 40, N 6, 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,  
editorial@immunologiya-journal.ru  
(for 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 10 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)

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

**Filatov Alexander**, Dr.Sci, PhD, prof. (Moscow, Russia)

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

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

**Gudima Georgii**, Dr.Sci, 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)

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

**Khaitov Musa**, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Muraro Antonella**, MD, PhD, prof. (Padova, Italy)

**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)

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

**Shilovskiy Igor**, Dr.Sci, PhD (Moscow, Russia)

**Valenta Rudolf**, MD, PhD, prof. (Vienna, Austria)

## EDITORIAL COUNCIL

**Karamov Edward**, Dr.Sci, PhD, prof. (Moscow, Russia)

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

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

**Nikolaeva Irina**, Dr.Sci, PhD (Moscow, Russia)

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

## INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

**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

# Contents

## Механизмы аллергических реакций

**Шиловский И.П., Никольский А.А., Ковчина В.И., Болотова С.И., Вишнякова Л.И., Соколова А.Р., Барвинская Е.Д., Хаитов М.Р.**

Активация Th17-иммунного ответа при экспериментальной нейтрофильной бронхиальной астме у мышей

## Онкоиммунология

**Кашутина М.И., Жернов Ю.В., Зубкова О.А., Порошина А.С., Кудлай Д.А., Григорьевский В.А., Хаитов М.Р.**

Изучение эффективности применения биоаналога ритуксимаба (Реддитукс®) у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой

## Иммуногенетика

**Килина Д.А., Карнишкина О.Ю., Смирнова Т.С., Галимова Э.С.**

Генетические маркеры ответа на терапию циклоспорином у больных псориазом

## Иммунология репродукции

**Артемьева К.А., Богданова И.М., Степанова И.И., Болтовская М.Н., Калужин О.В., Степанов А.А., Земляков А.Е.**

Особенности иммунного микроокружения в плаценте и гравидарном эндометрии у мышей со спонтанными, индуцированными и потенцированными абортми

## Клиническая иммунология

**Гурьянова С.В., Борисова О.Ю., Колесникова Н.В., Лежава Н.Л., Козлов И.Г., Гудима Г.О.**

Влияние мурамилпептида на микробный состав микрофлоры ротовой полости

## Методы

**Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В.**

Цитометрическая оценка связывания лектинов с различными популяциями тимоцитов мыши

**Николаева И.А., Кулага О.С., Авоян Г.Э., Смирнов В.В., Топтыгин А.Ю., Павленко М.К., Гороховец Н.В., Андреев И.В., Селезнев А.С., Мартынов А.И.**

Изучение аллергенов березы бородавчатой, выделенных из пыльцы, собранной в период с 2008 по 2015 г.

## Обзоры

**Пинегин Б.В., Хаитов Р.М.**

Современные принципы создания иммуноотропных лекарственных препаратов

**Лушова А.А., Жеремян Э.А., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Бязрова М.Г., Филатов А.В.**

Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры

## Mechanisms of allergic reactions

**5 Shilovskiy I.P., Nikolskii A.A., Kovchina V.I., Bolotova S.I., Vishniakova L.I., Sokolova A.R., Barvinskaya E.D., Khaitov M.R.**

Activation of Th17-immune response in a mouse model of neutrophilic asthma

## Oncoimmunology

**16 Kashutina M.I., Zhernov Yu.V., Zubkova O.A., Poroshina A.S., Kudlay D.A., Grigoryevsky V.A., Khaitov M.R.**

Effectiveness of rituximab biosimilar (Reddytux®) on the treatment of diffuse large B-cell lymphoma

## Immunogenetics

**22 Kilina D.A., Karnishkina O.Yu., Smirnova T.S., Galimova E.S.**

Genetic markers of response to cyclosporine treatment in psoriasis patients

## Immunology of reproduction

**26 Artemyeva K.A., Bogdanova I.M., Stepanova I.I., Boltovskaya M.N., Kalyuzhin O.V., Stepanov A.A., Zemlyakov A.E.**

Features of the immune microenvironment in the placenta and gravidar endometrium in mice with spontaneous, induced and potentiated abortions

## Clinical immunology

**34 Guryanova S.V., Borisova O.Yu., Kolesnikova N.V., Lezhava N.L., Kozlov I.G., Gudima G.O.**

The effect of muramyl peptide on the microbial landscape of the oral cavity

## Methods

**41 Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Polevshchikov A.V.**  
Cytometric assessment of lectins binding to various populations of murine thymocytes

**50 Nikolaeva I.A., Kulaga O.S., Avoyan G.E., Smirnov V.V., Topotygin A.Yu., Pavlenko M.K., Gorokhovets N.V., Andreev I.V., Seleznev A.S., Martynov A.I.**  
Studies of birch wart allergens obtained from pollen collected from 2008 to 2015 years

## Reviews

**57 Pinegin B.V., Khaitov R.M.**  
Modern principles of immunotropic drugs creation

**63 Lushova A.A., Zheremyan E.A., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., Byazrova M.G., Filatov A.V.**  
B-lymphocyte subsets: functions and molecular markers

## Механизмы аллергических реакций

© Коллектив авторов, 2019

Шиловский И.П., Никольский А.А., Ковчина В.И., Болотова С.И.,  
Вишнякова Л.И., Соколова А.Р., Барвинская Е.Д., Хайтов М.Р.

### Активация Th17-иммунного ответа при экспериментальной нейтрофильной бронхиальной астме у мышей

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

#### Резюме

Бронхиальная астма (БА) – гетерогенное хроническое воспалительное заболевание респираторного тракта. Большинство пациентов, страдающих от БА легкой и средней тяжести, поддаются лечению с применением кортикостероидов. Однако существует группа пациентов (до 10%) с тяжелой формой БА, которые резистентны к стандартной терапии кортикостероидами. Изучение данного феномена выявило взаимосвязь тяжелого протекания БА с активацией Th1- и Th17-иммунного ответа и нейтрофильного воспаления в легких. В то же время у пациентов, хорошо отвечающих на терапию кортикостероидами, как правило, наблюдается Th2-опосредованное эозинофильное воспаление дыхательных путей. В данном исследовании для детального понимания механизмов резистентности к кортикостероидам мы разработали модель БА у мышей с преобладающим нейтрофильным, а не эозинофильным типом воспаления. Для этого мышью линии BALB/c иммунизировали смесью модельного аллергена овальбумина и адьюванта Фрейнда с последующей аэрозольной провокацией тем же самым аллергеном в смеси с липополисахаридом из *E. coli*. В результате у мышей развивались ключевые проявления нейтрофильной БА: продукция аллерген-специфических антител класса IgE, развитие гиперреактивности бронхов, ремоделирование респираторного тракта и инфильтрация ткани легких нейтрофилами. При этом формирование данной патологии протекало по Th17-зависимым механизмам, что соответствует клинической картине, наблюдаемой в практике. Созданная модель нейтрофильной БА может быть использована как для изучения патогенеза заболевания, так и для тестирования новых подходов к его терапии.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма; модель на мышах; Th17-иммунный ответ

Статья поступила 16.09.2019. Принята в печать 16.10.2019.

**Для цитирования:** Шиловский И.П., Никольский А.А., Ковчина В.И., Болотова С.И., Вишнякова Л.И., Соколова А.Р., Барвинская Е.Д., Хайтов М.Р. Активация Th17-иммунного ответа при экспериментальной нейтрофильной бронхиальной астме у мышей. Иммунология. 2019; 40 (6): 5–15. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16001

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МД-1578.2019.4 (075-15-2019-224).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции  
Шиловский Игорь Петрович –  
доктор биологических наук,  
заместитель директора  
по науке и инновациям  
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»  
ФМБА России,  
Москва, Россия  
E-mail: ip.shilovsky@nrcki.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-5343-4230>

Shilovskiy I.P., Nikolskii A.A., Kovchina V.I., Bolotova S.I., Vishniakova L.I.,  
Sokolova A.R., Barvinskaya E.D., Khaitov M.R.

### Activation of Th17-immune response in a mouse model of neutrophilic asthma

National Research Center – Institute of immunology of Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russia

#### Abstract

Bronchial asthma (BA) is a heterogeneous chronic inflammatory disease of the respiratory tract. The majority of patients with mild to moderate BA are well respond to corticosteroid treatment. However, there is a group of patients (up to 10% of BA cases) with severe BA which resistant to conventional corticosteroid therapy. A detailed study of this phenomenon revealed a relationship between the severity of BA, activation of Th1- and Th17-immune responses and

neutrophilic type of inflammation. At the same time patients with Th2-mediated eosinophilic pulmonary inflammation respond to corticosteroids well. In order to understand the mechanisms of corticosteroid resistance we developed a model of BA in mice with a predominant neutrophilic rather than eosinophilic type of inflammation. BALB/c mice were immunized with the mixture of the ovalbumin allergen and Freund's adjuvant, followed by aerosol challenge with the same allergen mixed with *E. coli* lipopolysaccharide. As a result, mice developed key manifestations of neutrophilic BA: production of allergen-specific IgE antibodies, development of bronchial hyperreactivity, remodeling of the respiratory tract and infiltration of lung tissue with neutrophils. Moreover, the development of this pathology was Th17-dependent, that corresponds to the clinical observations in human. The presented model of neutrophilic BA in mice can be used both for studying the pathogenesis of the disease, and for testing new approaches to its therapy.

**Keywords:** bronchial asthma; mouse model; Th17-immune response

**Received** 16.09.2019. **Accepted** 16.10.2019.

**For citation:** Shilovskiy I.P., Nikolskii A.A., Kovchina V.I., Bolotova S.I., Vishniakova L.I., Sokolova A.R., Barvinskaya E.D., Khaitov M.R. Activation of Th17-immune response in a mouse model of neutrophilic asthma. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 5–15. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16001

**Funding.** The study was supported by the grant of the President of Russian Federation No. MD-1578.2019.4 (075-15-2019-224).

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

**For correspondence**  
Shilovskiy Igor P. – Dr.Sci., PhD,  
Deputy Director  
for Science and Innovation,  
NRC Institute of Immunology  
FMBA of Russia,  
Moscow, Russia  
E-mail: ip.shilovskiy@nrcii.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-5343-4230>

## Введение

Бронхиальная астма (БА) – гетерогенное заболевание, которое обычно характеризуется хроническим воспалением дыхательных путей и сопровождается такими симптомами, как свистящие хрипы, одышка, заложенность в груди и кашель [1]. В отдельных регионах мира от БА страдает до 18% населения, а в целом мире диагноз БА был поставлен около 300 млн пациентов [2, 3]. В России общее число пациентов с диагнозом БА приближается к 10 млн человек, что составляет около 7% населения страны [4, 5]. Экономические потери от БА сопоставимы с ущербом от таких заболеваний, как диабет и цирроз печени. В США национальные медицинские расходы на борьбу с астмой оцениваются на уровне 18 млрд долл. в год; в странах Евросоюза примерно 17,7 млрд евро ежегодно [6, 7]. В России затраты государства на лечение пациентов с БА составляют примерно 130 млрд рублей в год [4].

С развитием молекулярно-биологических методов исследований и, главным образом, по мере активного использования генно-модифицированных животных удалось в значительной степени раскрыть молекулярные и клеточные механизмы патогенеза БА. В частности, была установлена роль Th2-клеток и врожденных лимфоидных клеток 2-го типа (ILC2 – type 2 innate lymphoid cells), а также продуцируемых ими цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9 и ИЛ-13) в формировании основных проявлений БА: продукции аллерген-специфических антител класса IgE [8], развитии гиперреактивности бронхов (ГРБ), эозинофильного воспаления легких, ремоделирования бронхов и др. [3, 9, 10].

Длительное время считалось, что БА развивается исключительно по Th2-зависимому механизму, сопряженному с эозинофильным воспалением дыхатель-

ных путей и IgE-опосредованной активацией тучных клеток. Однако к настоящему времени БА рассматривается как гетерогенное заболевание, включающее в себя несколько субгрупп патологии [11]. Накоплены экспериментальные свидетельства участия других воспалительных клеток – нейтрофилов – в патогенезе БА. В частности, количество нейтрофилов в мокроте коррелировало с тяжестью заболевания [12].

В отличие от эозинофильной, нейтрофильная астма трудно поддается традиционному лечению глюкокортикостероидами [13, 14], и поэтому необходимы альтернативные терапевтические подходы. По эпидемиологическим данным до 10% пациентов с БА проявляют резистентность к терапии глюкокортикостероидами [15, 16]. На сегодняшний день в мировой научной литературе описано множество моделей БА (см. обзоры [17–19]), особенно с использованием мышей [20–22]. Однако в подавляющем большинстве работ моделируются проявления астмы с эозинофильным типом воспаления легких. С учетом вышесказанного, целью данной работы было создание модели нейтрофильной БА с использованием различных протоколов иммунизации у мышей.

## Материал и методы

**Лабораторные животные.** Самок мышей линии BALB/c возрастом 6–8 нед, весом 18–20 г приобретали в питомнике лабораторных животных Филиала ИБХ РАН в г. Пушкино (Россия). Животных кормили стандартным лабораторным кормом для грызунов («Дельта Фидс», Россия). Мышам был предоставлен неограниченный доступ к воде. Эксперименты на животных проводились в соответствии с принципами Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. по охране животных,

используемых в научных целях и были одобрены Этическим комитетом ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России.

**Протокол эксперимента.** Мыши были разделены на 4 группы (по 8 мышей в каждой). Животных первой группы (OVA/Alum) иммунизировали 3 раза (в дни 1, 14 и 28) внутрибрюшинно 0,2 мл смеси, состоящей из 20 мкг модельного аллергена овальбумина (OVA) (Sigma-Aldrich, США) и 2 мг адьюванта – гидроокиси алюминия [Al(OH)<sub>3</sub>] (Sigma-Aldrich, США). Мышам второй группы (OVA/FA) в том же объеме в первый день вводили внутрибрюшинно 20 мкг OVA эмульгированного в 100 мкл полного адьюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich, США). В 14-й и 28-й дни вводили внутрибрюшинно 20 мкг OVA, эмульгированного в 100 мкл неполного адьюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich, США). Третья группа лабораторных мышей (OVA/LPS) была иммунизирована по протоколу, аналогичному группе OVA/FA. В 42–44-й дни животным двух первых экспериментальных групп вводили раствор 10 мг/мл OVA в виде аэрозоля в течение 20 мин, а животным группы OVA/LPS – модельный аллерген в той же концентрации, но в смеси с 0,4 мг/мл ЛПС *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, США). Животные четвертой группы (Норма) никаким манипуляциям не подвергались. На 45-е сутки у мышей оценивали ГРБ и собирали кровь для определения уровней аллерген-специфических антител. На 46-й день мышей забивали цервикальной дислокацией и отбирали образцы бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) для последующего определения клеточного состава, левое легкое фиксировали в 10% формалине (Carl

Roth, Германия) для последующего изготовления гистологических срезов и оценки выраженности признаков воспаления (рис. 1).

**Имуноферментный анализ (ИФА).** После последней аэрозольной провокации аллергеном из ретро-орбитального синуса мышей собирали периферическую кровь. Индивидуальные образцы сывороток получали путем центрифугирования при 350g в течение 15 мин при комнатной температуре и хранили при -70 °С до анализа. Уровни OVA-специфических антител IgE, IgG1 и IgG2a в сыворотке измеряли методом ИФА с использованием коммерческих наборов (Becton Dickinson, США).

**Изучение гиперреактивности бронхов.** Измерение ГРБ проводили на 45-е сутки после начала эксперимента. С помощью прибора для общей плетизмографии FinePointe NAM (Вухсо, США) оценивали удельное сопротивление дыхательных путей (sRaw) в ответ на ингаляционное введение возрастающих концентраций ментахолина (Sigma-Aldrich, США): 6,25, 12,5 и 25 мг/мл. Методика детально описана в публикациях [20, 22].

**Клеточный состав БАЛ.** Взятие образцов БАЛ проводили на 46-й день эксперимента. Для этого у мышей сепарировали трахею и вводили в нее шприцем 0,5 мл полной среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 25 мМ HEPES («ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Филиппины), 300 мг/л L-глутамина («ПанЭко», Россия) и 50 мг/мл гентамицина (Gibco, США), затем отбирали введенную в легкие жидкость. В полученных образцах проводили подсчет общего количества клеток в камере Горяева.

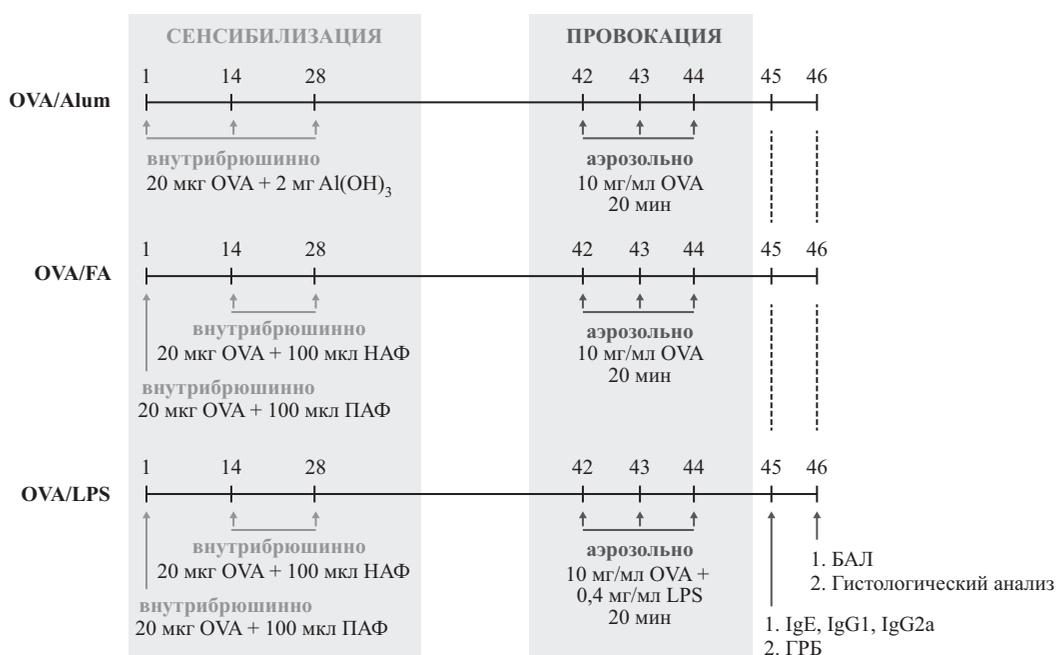


Рис. 1. Дизайн исследования

Протоколы иммунизаций мышей модельным аллергеном трех экспериментальных групп (см. описание в тексте); OVA – овальбумин; ПАФ – полный адьювант Фрейнда; НАФ – неполный адьювант Фрейнда; LPS – липополисахарид, ГРБ – гиперреактивность бронхов; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж.

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов

Ген-мишень	Праймер/зонд	Последовательность
<i>Actb</i>	Прямой	CTTTGCAGCTCCTTCGTTG
	Зонд	(ROX) GCCCTAGGCACCAGGGTGTGATG (RTQ2)
	Обратный	CACATAGGAGTCCTTCTGAC
<i>Ifng</i>	Прямой	AAATCCTGCAGAGCCAGATTAT
	Зонд	(ROX) ACGCTTATGTTGTTGCTGATGGCC (RTQ2)
	Обратный	GCTGTTGCTGAAGAAGGTAGTA
<i>Il4</i>	Прямой	AGAGAGTGAGCTCGTCTGTAG
	Зонд	(FAM) CTCTGCAGCTCCATGAGAACACTAGAG (BHQ1)
	Обратный	GGTGCAGCTTATCGATG
<i>Il17f</i>	Прямой	GGATTACAACATCACTCGAGAC
	Зонд	(FAM) CAGACACTCAGGCTGCATCAATGC (RTQ1)
	Обратный	CAGGATTTCTTGCTGAATG

Далее образцы БАЛ центрифугировали в течение 7 минут при 2000 об/мин при 4 °С. Часть осадка клеток наносили на предметное стекло, высушивали около часа, затем фиксировали метанолом («Химмед», Россия) в течение 15 мин, после чего высушивали в течение 12 ч и окрашивали азур-эозином («ГЕМСТАНДАРТ-Р», Россия). Клеточный состав мазка БАЛ определяли с помощью световой микроскопии, проводя подсчет не менее 300 клеток на один мазок при увеличении в 400 раз.

**Гистологические исследования ткани легких.** Для приготовления микропрепаратов легкие после длительной фиксации в формалине обезживали путем проводки по спиртам и заливали образцы в парафин. Микрометрированием парафиновых блоков получали срезы легких толщиной 4–6 мкм. Полученные препараты окрашивали гематоксилин-эозином (Bio-Optica, Италия) для идентификации эозинофилов, нейтрофилов и лимфоцитов. Гистологическое исследование микропрепаратов легких осуществляли на световом микроскопе (Olympus, Япония). Проводили полуколичественную оценку воспалительных изменений и ремоделирования бронхов по методике, описанной в статье [23]. Выраженность признаков воспаления оценивали в баллах, где: «0» – отсутствует, «1» – слабая, «2» – умеренная, «3» – тяжелая.

**Определение экспрессии генов в клетках БАЛ методом РВ-ПЦР.** Общую РНК выделяли из клеток БАЛ с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Затем ее использовали в реакции обратной транскрипции для получения библиотеки кДНК с применением набора ОТ-1 («Синтол», Россия). При постановке реакции использовали неспецифические гексамерные праймеры. Полученную кДНК в дальнейшем использовали для детекции мРНК генов-мишеней в образцах БАЛ при помощи ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с применением амплификатора iCycler IQ5 (Bio-Rad, США) и специфической пары праймеров и зонда (табл. 1). В качестве контроля для последующей нормализации, определяли уровень экспрессии гена *Actb*, кодирующего β-актин.

**Статистический анализ данных.** Для всех количественных данных вычисляли среднее арифметическое

и стандартную ошибку среднего. Межгрупповые различия определяли с помощью непараметрического *U*-критерия Манна-Уитни. Для полуколичественных данных вычисляли медиану и межквартильный размах. Межгрупповые различия определяли с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. Статистический анализ выполняли с применением программного обеспечения Statistica 12.0 (StatSoft inc., США).

## Результаты

**Изменение уровней специфических антител в сыворотке крови.** На следующий день после последней провокации (на 45-й день) у мышей брали кровь для последующей количественной оценки уровней аллерген-специфического антитела. Антитела класса IgE и субклассов IgG1, IgG2a наблюдались в образцах сыворотки крови мышей всех трех экспериментальных групп. Уровни IgE и IgG2a были сопоставимы во всех трех группах, где моделировалась БА. Однако у мышей, иммунизированных аллергеном в комплексе с адьювантом Фрейнда (группы OVA/FA и OVA/LPS), рост уровней IgG1 был более существенным в сравнении с мышами, иммунизированными той же дозой аллергена, но в смеси с другим адьювантом – гидроокисью алюминия (группа OVA/Alum), в 2 и 3 раза соответственно (рис. 2А).

**Изменение гиперреактивности бронхов.** Гиперреактивность бронхов является характерной чертой БА. Поэтому через сутки после последней провокации аллергеном (45-й день) оценивали ГРБ мышей в ответ на ингаляционные введения возрастающих концентраций бронхоконстриктора метахолина. Во всех экспериментальных группах животных наблюдался статистически значимый рост ГРБ в сравнении с группой «Норма» (рис. 2, Б). Стоит отметить, что у мышей, иммунизированных смесью аллергена и адьюванта Фрейнда с последующей провокацией тем же аллергеном в смеси с ЛПС (группа OVA/LPS), развивалась менее выраженная ГРБ в сравнении с другими экспериментальными группами (группы OVA/FA и OVA/LPS). Прирост ГРБ в группе OVA/LPS в среднем составил 30%, в то время как в группах OVA/FA и OVA/LPS гиперреактивность

бронхов была повышена в среднем на 55% в сравнении с группой «Норма» (рис. 2Б).

**Изменение клеточного состава БАЛ.** Через 2 суток после последней провокации у мышей был изучен клеточный состав БАЛ. Статистически значимый рост количества клеток в БАЛ происходил во всех трех экспериментальных группах (OVA/Alum, OVA/FA и OVA/LPS) в сравнении с группой «Норма». Однако наибольший рост отмечался у мышей, иммунизированных аллергеном в комплексе с адъювантом Фрейнда с последующей провокацией тем же самым аллергеном в смеси с ЛПС (группа OVA/LPS). В этой группе количество клеток в БАЛ достигало  $496\ 667 \pm 72\ 049$  кл/мл, что в 3,6 раза больше, чем у мышей, иммунизированных аллергеном в смеси с гидроокисью алюминия (группа OVA/Alum) и в 8,2 раза большей чем в группе «Норма» (рис. 3А).

Количество макрофагов в БАЛ у мышей из групп OVA/Alum и OVA/FA статистически значимо не отличалось от группы «Норма». Однако у мышей, получавших ингаляции смесью аллергена и ЛПС, выявлен значительный рост количества этих клеток, достигавший значения  $384\ 156 \pm 67\ 775$  кл/мл, что в 7 раз превышает соответствующую величину в группе «Норма» (рис. 3Б).

Как ожидалось, значительное количество эозинофилов –  $43\ 971 \pm 12\ 182$  кл/мл – выявлено в БАЛ мышей, иммунизированных аллергеном в смеси с гидроокисью алюминия (группа OVA/Alum). У мышей, иммунизированных аллергеном в смеси с другим адъювантом – адъювантом Фрейнда (группа OVA/FA), количество этих клеток в БАЛ было значительно меньше  $10\ 800 \pm 2\ 481$  кл/мл. В группах «Норма» и «OVA/LPS» эозинофилы практически не выявлялись (рис. 3В).

Другие провоспалительные клетки – нейтрофилы, практически не обнаруживались у мышей, иммунизированных аллергеном в смеси с гидроокисью алюминия ( $2543 \pm 1027$  кл/мл), тогда как у мышей, получавших ингаляции аллергена в смеси с ЛПС (группа OVA/LPS), количество нейтрофилов было в 18 раз больше и достигало  $39\ 800 \pm 8843$  кл/мл (рис. 3Г). Лимфоциты обнаруживались в значительных количествах в БАЛ всех трех экспериментальных групп – OVA/Alum, OVA/FA и OVA/LPS (рис. 3Д).

**Гистологические изменения в ткани легких.** Гистологический анализ выявил значительное воспаление в ткани легких у мышей всех трех экспериментальных групп (OVA/Alum, OVA/FA и OVA/LPS) в сравнении с группой «Норма». Гистологическое исследование в целом подтвердило данные, полученные при анализе клеточного состава БАЛ. В частности, инфильтрация дыхательных путей эозинофилами ожидаемо наблюдалась у мышей, иммунизированных аллергеном в смеси с гидроокисью алюминия (группа OVA/Alum), а также в группе OVA/FA. В то же время нейтрофилы в значительной степени выявлялись в группе OVA/LPS (рис. 4). Была оценена не только степень перибронхиальной инфильтрации воспалительными клетками, но и выраженность признаков ремоделирования дыхательных путей, таких как: гипертрофия гладких мышц, ме-

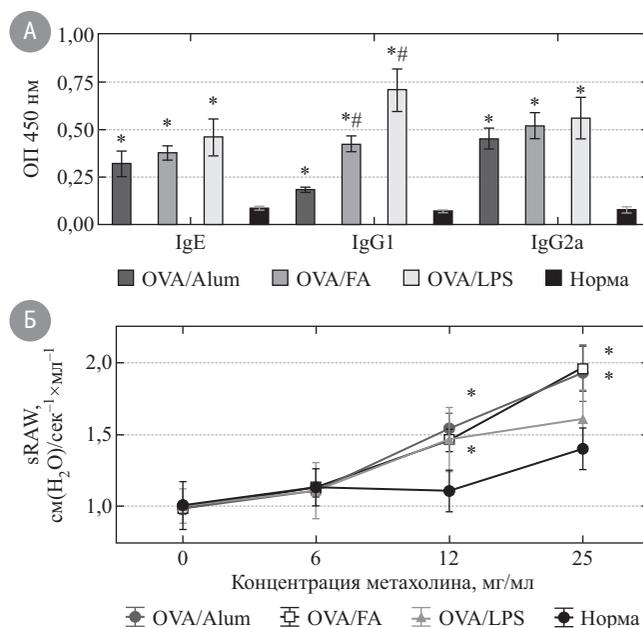


Рис. 2. Уровни аллерген-специфических антител (А) и гиперреактивность бронхов в ответ на аэрозольное введение возрастающих концентраций метахолина (Б)

А – уровни аллерген-специфических антител класса IgE и subclasses IgG1 и IgG2a в сыворотке крови; представлены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка,  $n=8$ ; Б – гиперреактивность бронхов оценивалась по показателю – удельное сопротивление дыхательных путей (sRaw); представлены средние значения  $\text{см}(\text{H}_2\text{O}) \times \text{сек}^{-1} \times \text{мл}^{-1} \pm$  стандартная ошибка,  $n=8$ . Здесь и на рис. 2–5: \* – статистически значимо отличается от группы «Норма»; # – статистически значимо отличается от группы «OVA/Alum» по U-критерию Манна–Уитни. Отличия принимались значимыми при  $p \leq 0,05$ .

таплазия и гиперплазия бронхиальных клеток эпителия бронхов. Гипертрофия гладких мышц не наблюдалась ни в одной экспериментальной группе. Метаплазия и гиперплазия бокаловидных клеток бронхиального эпителия наблюдались во всех экспериментальных группах (OVA/Alum, OVA/FA и OVA/LPS), но не наблюдалась в группе «Норма» (рис. 4).

**Экспрессия генов цитокинов в дыхательных путях.** Методом количественного ПЦР-анализа была изучена экспрессия генов *Ifng*, *Il4* и *Il17f* в клетках, выделенных из образцов БАЛ. Использование смеси OVA и ЛПС для ингаляции приводило к значительной (в 10 раз) активации экспрессии *Il17f* (рис. 5В). Экспрессия ИФН- $\gamma$  и IL-4 так же увеличивалась у этих мышей, однако не так значительно; в 7 и 4 раза, соответственно (рис. 5А, Б). Эти данные свидетельствуют о том, что развитие проявлений БА в данной модели происходит в большей степени по Th1- и Th17-механизмам.

## Обсуждение

Стандартная терапия кортикостероидами в подавляющем большинстве случаев позволяет хорошо контролировать течение БА. Однако примерно в 10% случаев

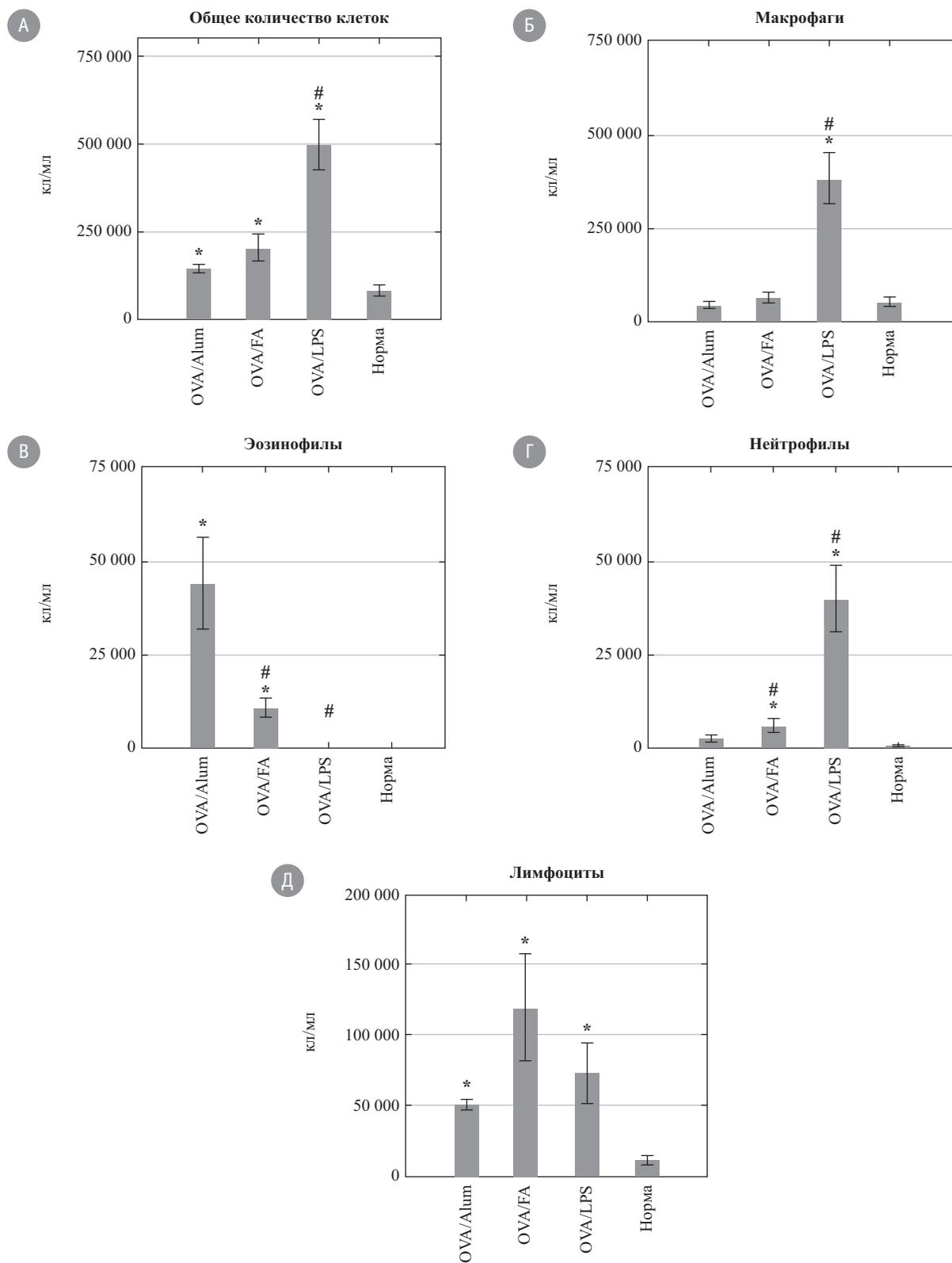


Рис. 3. Клеточный состав бронхоальвеолярного лаважа

Представлены средние значения количества клеток в 1 мл БАЛ ± стандартная ошибка,  $n = 8$ .

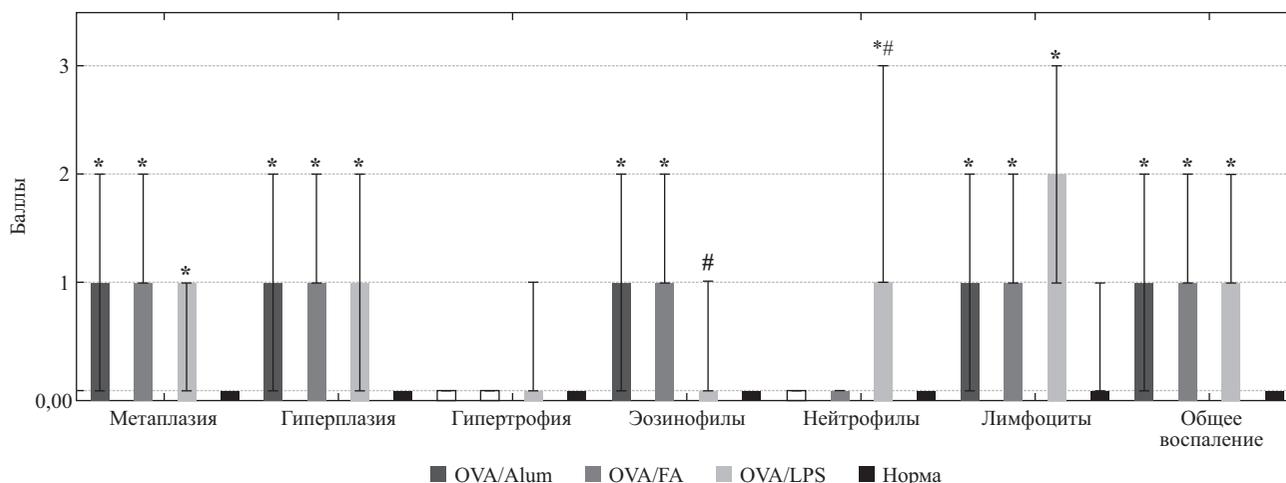


Рис. 4. Патологические изменения в ткани легких

Для оценки выраженности патологических процессов в дыхательных путях использовался полуколичественный метод оценки после дифференцированной окраски срезов органа гематоксилином и эозином. Выраженность признаков воспаления оценивали в баллах по следующей шкале: 0 – отсутствует; 1 – слабая; 2 – умеренная; 3 – тяжелая. Представлены средние значения  $\pm$  интерквартильный размах,  $n = 8$ .

наблюдается развитие тяжелой, стероид-резистентной астмы, которая сопровождается нейтрофильным воспалением в легких [14, 24–26]. Для того чтобы изучать механизмы нейтрофильной астмы, а также тестировать новые подходы к ее терапии, необходима разработка экспериментальной модели БА с преобладающим нейтрофильным типом воспаления.

Большинство описанных в научной литературе моделей БА воссоздают проявления так называемой эозинофильной астмы (см. обзоры [17–19, 27]). Ее моделирование чаще всего осуществляется с использованием смеси модельного аллергена овальбумина и адъюванта – гидроокиси алюминия, которыми иммунизируют мышей с последующей аэрозольной провокацией тем же самым аллергеном. При таком протоколе у мышей формируются проявления БА (развитие ГРБ, продукция аллерген-специфических антител класса IgE, ремодели-

рование дыхательных путей и т.д.), сопровождающиеся значительной инфильтрацией легких эозинофилами. При этом в индукции проявлений БА задействованы Th2-зависимые механизмы [21, 22].

Существует несколько публикаций, в которых описаны протоколы экспериментальной индукции БА с нейтрофильным типом воспаления легких. Например, в работе Ito и соавт. [28] описана модель БА, в которой у мышей развивалось смешанное воспаление в легких. В этом исследовании мышью BALB/c иммунизировали высокой дозой OVA (50 вместо 20 мкг/мышь) в смеси с гидроокисью алюминия с последующей аэрозольной провокацией более концентрированным раствором аллергена (25 вместо 10 мг/мл). Такой протокол позволил индуцировать незначительное нейтрофильное воспаление в легких; доля этих клеток в перибронхиальных инфильтратах достигала 7%, в то время как доля эозино-

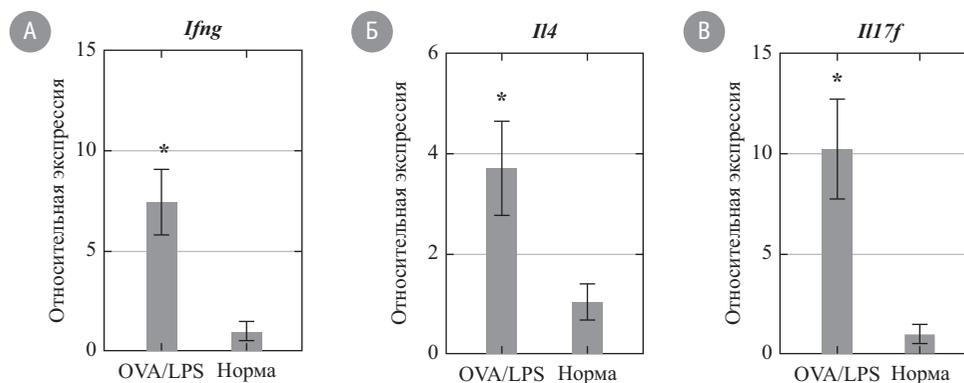


Рис. 5. Изменение экспрессии цитокинов бронхоальвеолярного лаважа

Представлены средние значения относительной экспрессии генов цитокинов *Ifng* (А), *IL4* (Б) и *IL17f* (В)  $\pm$  стандартная ошибка,  $n = 8$ . Уровень экспрессии гена в группе «Норма» был принят за 1.

филов составляла 45%. Однако при системном введении таким мышам дексаметазона доля эозинофилов снижалась до 20%, а доля нейтрофилов, наоборот, возрастала до 50% [28]. Это связано с тем, что глюкокортикостероиды вызывают апоптоз эозинофилов [29] и в то же время пролонгируют период полужизни нейтрофилов [30]. Аналогичный эффект наблюдают и в клинической практике, когда у пациентов, получающих длительную терапию глюкокортикостероидными препаратами, накапливаются нейтрофилы в дыхательных путях [11]. В нашем исследовании у мышей, получавших иммунизации смесью OVA и гидроокиси алюминия (OVA/Alum), нейтрофилы также обнаруживаются в БАЛ, но их доля незначительна и составляет менее 1% от общего количества клеток (рис. 3Г).

В работе Vogaert и соавт. [31] мышам иммунизировали модельным аллергеном овальбумином, но вместо гидроокиси алюминия использовали адъювант Фрейнда. В ходе этапа провокации мышам вводили те же аллергены в виде аэрозоля. В итоге авторы наблюдали формирование у мышей проявлений БА. Главным образом развивалось воспаление в ткани легких, в то время как другой важный признак патологии – ГРБ – авторами не оценивался. При анализе клеточного состава БАЛ была выявлена смешанная инфильтрация легких провоспалительными клетками – нейтрофилами и эозинофилами, содержание которых составляло 25 и 12%, соответственно, от общего количества клеток [31].

В другом исследовании описан аналогичный протокол иммунизации мышам линии C57BL/6 с использованием смеси OVA и адъюванта Фрейнда и последующей аэрозольной провокации OVA [32]. В результате у животных развивались ГРБ, гиперплазия бокаловидных клеток эпителия бронхов, а также детектировалось значительное количество нейтрофилов в БАЛ (около 50% от общего количества клеток), при этом эозинофилы также присутствовали в значительном количестве (20% от общего количества клеток). Вышеуказанные проявления патологии развивались по Th1- и Th17-зависимым механизмам, так как наблюдалась значительная активация экспрессии ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17. Системное введение дексаметазона не влияло на степень нейтрофильного воспаления в легких этих мышам и экспрессию ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17 [32].

В данном исследовании мы применили описанный выше протокол, когда мышам иммунизировали OVA в смеси с адъювантом Фрейнда с последующей провокацией раствором OVA (группа OVA/FA). Аналогично, при анализе клеточного состава БАЛ мы наблюдали смешанную инфильтрацию легких нейтрофилами и эозинофилами, количество которых составило  $5\,900 \pm 1766$  кл/мл и  $10\,800 \pm 2481$  кл/мл, что соответствовало 3 и 6% от общего количества клеток в БАЛ (рис. 3В, Г). Кроме того, в отличие от исследования Vogaert и соавт. [31], мы регистрировали развитие выраженной ГРБ в данной группе мышам. Известно, что гидроокись алюминия является так называемым Th2-адъювантом, в то время как адъювант Фрейнда преимущественно

поляризует иммунный ответ по Th1- и Th17-типу [33]. По всей видимости, замена гидроокиси алюминия на адъювант Фрейнда на этапе иммунизации привела к активации Th1- и Th17-зависимых механизмов и, как следствие, к заметной инфильтрации легких нейтрофилами. Учитывая тот факт, что, как в нашем исследовании, так и в работах P. Vogaert и соавт. [31] и L. De-jager и соавт. [32], кроме нейтрофилов, в легких мышам в значительном количестве обнаруживались эозинофилы, можно предположить, что Th2-иммунный ответ на вводимый аллерген у этих мышам также был активирован. Это предположение подтверждается тем, что выявлена активация в БАЛ не только экспрессии ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17, но и Th2-цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-13) [31].

Опубликовано несколько исследований, в которых для индукции экспериментальной БА вместо OVA применяли причинно-значимый аллерген клещей домашней пыли (HDM) [34–37]. В работе Gavino и соавт. [34] раствор экстракта HDM вводили мышам ингаляционно в течение 3 недель без предварительной парентеральной иммунизации, после чего у них формировались признаки БА: ГРБ, гиперсекреция слизи и ремоделирование бронхов. В развитие этих патологических изменений лежат Th2- и Th17-зависимые механизмы, так как в легких мышам активировалась экспрессия как ИЛ-4, так и ИЛ-17 [34]. В другой работе H.T.T. Tan и соавт. [37] использовали похожий протокол, когда раствор HDM в высокой концентрации четырехкратно вводили мышам в виде аэрозоля. В результате также наблюдали нейтрофильное воспаление в легких, ГРБ, гиперсекрецию слизи и ремоделирование респираторного тракта [37]. Такой эффект экстракта HDM авторы связывают с тем, что содержащийся в нем аллерген Der p способствует формированию аллергической реакции, сопровождающейся продукцией аллерген-специфических антител класса IgE, инфильтрацией легких эозинофилами. В то же время содержащиеся в экстракте липополисахариды активируют Th17-опосредованную нейтрофилию легких [34].

Поэтому в ряде исследований для индукции нейтрофильного типа воспаления применяли липополисахариды [35, 36, 38]. L. Xu и соавт. иммунизировали мышам внутрибрюшинно смесью OVA, HDM, гидроокиси алюминия и ЛПС с последующими провокациями OVA и HDM. Использование ЛПС способствовало значительному усилению нейтрофильного воспаления; доля этих клеток в БАЛ достигала 30% от их общего количества [35]. В работе An и соавт. ЛПС применялся не для иммунизации мышам, а для аэрозольной провокации в смеси с аллергеном OVA, что также приводило к значительной инфильтрации легких нейтрофилами, доля которых в БАЛ составляла в среднем 20% [36].

В нашем исследовании, в отличие от работ [35] и [36], на этапе сенсibilизации применялся OVA в смеси с адъювантом Фрейнда с последующей провокацией смесью OVA и ЛПС (группа OVA/LPS). В результате в БАЛ значительно возрастало количество нейтрофилов (до  $39\,800 \pm 8\,843$  кл/мл, что составляло ~10% от общего количества клеток) и макрофагов (до  $384\,156 \pm$

67 775 кл/мл, что составляло ~75% от общего количества клеток) (рис. 3Б, Г). Эти данные согласуются с результатами работы Ап и соавт., которые также выявили значительную инфильтрацию нейтрофилами (~20%) и макрофагами (~60%) легких мышей, подвергнутых ингаляциям смесью OVA и ЛПС [36]. Однако, в отличие от исследования [36], где инфильтрация эозинофилами также была высокой и составляла ~20% от общего количества клеток БАЛ, в нашем эксперименте эозинофилы не выявлялись (рис. 3В).

Следует отметить, что смешанная инфильтрация легких эозинофилами и нейтрофилами, которая наблюдается в подавляющем большинстве исследований в моделях на мышах [28, 31, 32, 35, 36], в целом соответствует клинической картине, наблюдаемой у человека [11]. Однако для изучения механизмов нейтрофильного воспаления требуется создание модели на животных, в которой в очаге воспаления (в данном случае в легких) будут накапливаться преимущественно нейтрофилы. В данном исследовании мы описали протокол моделирования БА на мышах, при котором ткань легких экспериментальных животных преимущественно инфильтрирована нейтрофилами, а не эозинофилами. Для этого на этапе иммунизации животных аллергеном вместо гидроксида алюминия использовали адъювант Фрейнда, а на этапе провокации мышам ингаляционно вводили смесь аллергена и липополисахарида. Такой протокол позволил воссоздать у мышей основные проявления БА: помимо нейтрофильного воспаления в легких (рис. 3Г, рис. 4), развивалась выраженная ГРБ (рис. 2Б) и формировались признаки ремоделирования респираторного тракта – гиперплазия и метаплазия эпителия бронхов (рис. 4).

Известно, что нейтрофильное воспаление тесно связано с активацией Th17-клеток [39, 40], поэтому мы дополнительно изучили экспрессию маркерных генов Th1-, Th2- и Th17-иммунного ответа в клетках БАЛ мышей группы OVA/LPS, в которой отмечалась максимальная нейтрофилия ткани легких. В качестве Th1-маркера был выбран ген *Ifng*, кодирующий цитокин ИФН-γ (рис. 5А), в качестве Th2-маркера – ген *Il4*, кодирующий цитокин ИЛ-4 (рис. 5Б), в качестве Th17-маркера – ген *Il17f*, кодирующий цитокин ИЛ-17F (рис. 5В). Мы подтвердили, что нейтрофильное воспаление в группе OVA/LPS ассоциировано с значительной активацией экспрессии гена *Il17f* (рис. 5В), в то время как экспрессия генов *Ifng* и *Il4* увеличивалась, но не так значительно (рис. 5А, Б).

Таким образом, нами предложен протокол индукции экспериментальной нейтрофильной БА у мышей, который включает внутрибрюшинную иммунизацию смесью модельного аллергена овальбумина и адъюванта Фрейнда с последующей аэрозольной провокацией тем же самым аллергеном в смеси с ЛПС. Данный подход позволил воспроизвести основные проявления нейтрофильной БА: продукцию аллерген-специфических антител класса IgE, развитие гиперреактивности бронхов, ремоделирование респираторного тракта и инфильтрацию ткани легких нейтрофилами. При этом формирование данной патологии протекало по Th17-зависимым механизмам, что соответствует клинической картине заболевания.

Таким образом, нами предложен протокол индукции экспериментальной нейтрофильной БА у мышей, который включает внутрибрюшинную иммунизацию смесью модельного аллергена овальбумина и адъюванта Фрейнда с последующей аэрозольной провокацией тем же самым аллергеном в смеси с ЛПС. Данный подход позволил воспроизвести основные проявления нейтрофильной БА: продукцию аллерген-специфических антител класса IgE, развитие гиперреактивности бронхов, ремоделирование респираторного тракта и инфильтрацию ткани легких нейтрофилами. При этом формирование данной патологии протекало по Th17-зависимым механизмам, что соответствует клинической картине заболевания.

## ■ Литература

- Bateman E.D., Hurd S.S., Barnes P.J., Bousquet J. et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2018; 51 (2): 143–178. doi: 10.1183/13993003.51387-2007.
- Linneberg A, Dam Petersen K, Hahn-Pedersen J, Hammerby E. et al. Burden of allergic respiratory disease: a systematic review. *Clin Mol Allergy*. 2016; 14: 12. doi: 10.1186/s12948-016-0049-9.
- Akdis C.A., Agache I. Global Atlas of Asthma. *Eur Acad Allergy Clin Immunol*. 2013; 196.
- Гудима Г.О., Ильина Н.И. Аллергия. Фундаментальные проблемы и практические вопросы. *Иммунология*. 2014; 35 (1): 48–50.
- Козулина И.Е., Курбачева О.М., Ильина Н.И. Аллергия сегодня. Анализ новых эпидемиологических данных. *Российский аллергологический журнал*. 2014; 3: 3-10.
- Bahadori K., Doyle-Waters M.M., Marra C., Lynd L. et al. Economic burden of asthma: a systematic review. *BMC Pulm Med*. 2009; 9 (1): 24. doi: 10.1186/1471-2466-9-24.
- Accordini S., Corsico A.G., Braggion M., Gerbase M.W. et al. The cost of persistent asthma in Europe: an international population-based study in adults. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013; 160 (1): 93–101. doi: 10.1159/000338998.
- Гушин И.С. IgE-опосредованная гиперчувствительность как ответ на нарушение барьерной функции тканей. *Иммунология*. 2015; 36 (1): 45–52.
- Woodruff P.G., Modrek B., Choy D.F., Jia G. et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180 (5): 388–395. doi: 10.1164/rccm.200903-0392OC.
- Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Медуницын Н.В. Механизмы аллергической реакции немедленного типа, препараты и методы специфической иммунотерапии. *Иммунология*. 2016; 37 (1): 51–60.
- Wenzel S.E. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012; 18 (5): 716–725. doi: 10.1038/nm.2678.
- Moore W.C., Hastie A.T., Li X., Li H. et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133 (6): 1557–1563. e5. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.011.
- Pelaia G., Vatrella A., Busceti M.T., Gallelli L. et al. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 879783. doi: 10.1155/2015/879783.
- Chambers E.S., Nanzer A.M., Pfeiffer P.E., Richards D.F. et al. Distinct endotypes of steroid-resistant asthma characterized by IL-17A high and IFN-γ high immunophenotypes: Potential benefits of calcitriol. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 136 (3): 628–637.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2015.01.026.
- Dockrell M., Partridge M.R., Valovirta E. The limitations of severe asthma: The results of a European survey. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2007; 62 (2): 134–141. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01304.x.
- Holgate S.T., Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet*. 2006; 368 (9537): 780–793. doi: 10.1016/S0140-6736(06)6288-X.
- Shin Y.S., Takeda K., Gelfand E.W. Understanding asthma using animal models. *Allergy, Asthma Immunol Res*. 2009; 1 (1): 10–18. doi: 10.4168/aaair.2009.1.1.10.
- Aun M.V., Bonamichi-Santos R., Arantes-Costa F.M., Kalil J. et al. Animal models of asthma: utility and limitations. *J Asthma Allergy*. 2017; 10: 293–301. doi: 10.2147/JAA.S121092.
- Mullane K., Williams M. Animal models of asthma: Reprise or reboot? *Biochem Pharmacol*. 2014; 87 (1): 131–139. doi: 10.1016/j.bcp.2013.06.026.

20. Бабахин А.А., Шиловский И.П., Андреев И.В., Козмин Л.Д. и др. Экспериментальная алергенспецифическая иммунотерапия алерговакциной «Тимпол» на модели IgE-зависимой бронхиальной астмы у мышей. *Иммунология*. 2012; 33 (3): 134–141.
21. Shilovskiy I.P., Sundukova M.S., Babakhin A.A., Gaisina A.R. et al. Experimental protocol for development of adjuvant-free murine chronic model of allergic asthma. *J Immunol Methods*. 2019; 468: 10–19. doi: 10.1016/j.jim.2019.03.002.
22. Shilovskiy I.P., Babakhin A.A., Shershakova N.N., Kamyshnikov O.Y. et al. Adjuvant and adjuvant-free protocols produce similar phenotypes of allergic asthma in mice. *Curr Trends Immunol*. 2015; 16: 79–91.
23. Ennis D.P., Cassidy J.P., Mahon B.P. Acellular pertussis vaccine protects against exacerbation of allergic asthma due to *Bordetella pertussis* in a murine model. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005; 12 (3): 409–417. doi: 10.1128/CDLI.12.3.409-417.2005.
24. Wenzel S.E., Schwartz L.B., Langmack E.L., Halliday J.L. et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160 (3): 1001–1008. doi: 10.1164/ajrccm.160.3.9812110.
25. Nakagome K., Matsushita S., Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2012; 158: 96–102. doi: 10.1159/000337801.
26. Moore W.C., Hastie A.T., Li X., Li H. et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133 (6): 1557–1563. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.011.
27. Pichavant M., Goya S., Hamelmann E., Gelfand E.W. et al. Animal models of airway sensitization. *Curr Protoc Immunol*. 2007; 15 (15): 18. doi: 10.1002/0471142735.im1518s79.
28. Ito K., Herbert C., Siegle J.S., Vuppusetty C. et al. Steroid-resistant neutrophilic inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008; 39 (5): 543–550. doi: 10.1165/rcmb.2008-0028OC.
29. Woolley K.L., Gibson P.G., Carty K., Wilson A.J. et al. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154 (1): 237–243. doi: 10.1164/ajrccm.154.1.8680686.
30. Kato T., Takeda Y., Nakada T., Sendo F. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. *Nat Immunol*. 1995; 14 (4): 198–208.
31. Bogaert P., Naessens T., de Koker S., Hennuy B. et al. Inflammatory signatures for eosinophilic vs. neutrophilic allergic pulmonary inflammation reveal critical regulatory checkpoints. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2011; 300 (5): 679–690. doi: 10.1152/ajplung.00202.2010.
32. DeJager L., Dendoncker K., Eggermont M., Souffriau J. et al. Neutralizing TNF $\alpha$  restores glucocorticoid sensitivity in a mouse model of neutrophilic airway inflammation. *Mucosal Immunol*. 2015; 8: 1–14. doi: 10.1038/mi.2015.12.
33. Knudsen N.P.H., Olsen A., Buonsanti C., Follmann F. et al. Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Sci Rep*. 2016; 6: 19570. doi: 10.1038/srep19570.
34. Gavino A.C., Nahmod K., Bharadwaj U., Makedonas G. et al. STAT3 inhibition prevents lung inflammation, remodeling, and accumulation of Th2 and Th17 cells in a murine asthma model. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2016; 71 (12): 1684–1692. doi: 10.1111/all.12937.
35. Xu L., Sun W.J., Jia A.J., Qiu L.L. et al. MBD2 regulates differentiation and function of Th17 cells in neutrophils-dominant asthma via HIF-1 $\alpha$ . *J Inflamm (United Kingdom)*. 2018; 15 (1): 1–12. doi: 10.1186/s12950-018-0191-x.
36. An T.J., Rhee C.K., Kim J.H., Lee Y.R. et al. Effects of macrolide and corticosteroid in neutrophilic asthma mouse model. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2018; 81 (1): 80–87. doi: 10.4046/trd.2017.0108.
37. Tan H.T.T., Hagner S., Ruchti F., Radzikowska U. et al. Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2019; 74 (2): 294–307. doi: 10.1111/all.13619.
38. Бабахин А.А., Ласкин А.А., Никонова А.А., Камышников О.Ю. и др. Моделирование бронхиальной астмы с нейтрофильным фенотипом воспаления. *Иммунология*. 2017; 38 (4): 199–205.
39. Liu W., Liu S., Verma M., Zafar I. et al. Mechanism of TH2/TH17-predominant and neutrophilic TH2/TH17-low subtypes of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 139 (5): 1548–1558. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.032.
40. Morishima Y., Ano S., Ishii Y., Ohtsuka S. et al. Th17-associated cytokines as a therapeutic target for steroid-insensitive asthma. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013: 1–9. doi: 10.1155/2013/609395.

## References

1. Bateman E.D., Hurd S.S., Barnes P.J., Bousquet J., et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2018; 51 (2): 143–178. doi: 10.1183/13993003.51387-2007.
2. Linneberg A., Dam Petersen K., Hahn-Pedersen J., Hammerby E., et al. Burden of allergic respiratory disease: a systematic review. *Clin Mol Allergy*. 2016; 14: 12. doi: 10.1186/s12948-016-0049-9.
3. Akdis C.A., Agache I. Global Atlas of Asthma. *Eur Acad Allergy Clin Immunol*. 2013; 196.
4. Gudima G.O., Ilina N.I. Allergy – basic problems and practical questions. *Immunologiya*. 2014; 35 (1): 48–50. (in Russian)
5. Kozulina I.E., Kurbacheva O.M., Ilina N.I. Allergy today. Analysis of new epidemiological data. *Rossiyskiy allergologicheskij zhurnal*. 2014; 3: 3–10. (in Russian)
6. Bahadori K., Doyle-Waters M.M., Marra C., Lynd L., et al. Economic burden of asthma: a systematic review. *BMC Pulm Med*. 2009; 9 (1): 24. doi: 10.1186/1471-2466-9-24.
7. Accordini S., Corsico A.G., Braggioni M., Gerbase M.W., et al. The cost of persistent asthma in Europe: an international population-based study in adults. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013; 160 (1): 93–101. doi: 10.1159/000338998.
8. Gushchin I.S. IgE-mediated hypersensitivity as a response to barrier tissue dysfunction. *Immunologiya*. 2015; 36 (1): 45–52. (in Russian)
9. Woodruff P.G., Modrek B., Choy D.F., Jia G., et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180 (5): 388–395. doi: 10.1164/rccm.200903-0392OC.
10. Soldatov A.A., Avdeeva Z.I., Medunitsin N.V. Mechanisms of allergic reactions of immediate type, drugs and methods of immunotherapy. *Immunologiya*. 2016; 37 (1): 51–60. (in Russian)
11. Wenzel S.E. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012; 18 (5): 716–725. doi: 10.1038/nm.2678.
12. Moore W.C., Hastie A.T., Li X., Li H., et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133 (6): 1557–1563. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.011.
13. Pelaia G., Vatrella A., Busceti M.T., Gallelli L. et al. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 879783. doi: 10.1155/2015/879783.
14. Chambers E.S., Nanzer A.M., Pfeffer P.E., Richards D.F., et al. Distinct endotypes of steroid-resistant asthma characterized by IL-17A high and IFN- $\gamma$  high immunophenotypes: Potential benefits of calcitriol. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 136 (3): 628–637.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2015.01.026.
15. Dockrell M., Partridge M.R., Valovirta E. The limitations of severe asthma: The results of a European survey. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2007; 62 (2): 134–141. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01304.x.
16. Holgate S.T., Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet*. 2006; 368 (9537): 780–793. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69288-X.
17. Shin Y.S., Takeda K., Gelfand E.W. Understanding asthma using animal models. *Allergy, Asthma Immunol Res*. 2009; 1 (1): 10–18. doi: 10.4168/aa.2009.1.1.10.
18. Aun M.V., Bonamichi-Santos R., Arantes-Costa F.M., Kalil J., et al. Animal models of asthma: utility and limitations. *J Asthma Allergy*. 2017; 10: 293–301. doi: 10.2147/JAA.S121092.

19. Mullane K., Williams M. Animal models of asthma: Reprise or reboot? *Biochem Pharmacol.* 2014; 87 (1): 131–139. doi: 10.1016/j.bcp.2013.06.026.
20. Babakhin A.A., Shilovsky I.P., Andreev I.V., Kozmin L.D., et al. Experimental allergen-specific immunotherapy with the use of a Timpol allergovaccine as exemplified by the murine model of IgE-dependent bronchial asthma. *Immunologiya.* 2012; 33 (3): 134–141. (in Russian)
21. Shilovskiy I.P., Sundukova M.S., Babakhin A.A., Gaisina A.R., et al. Experimental protocol for development of adjuvant-free murine chronic model of allergic asthma. *J Immunol Methods.* 2019; 468 (March): 10–19. doi: 10.1016/j.jim.2019.03.002.
22. Shilovskiy I.P., Babakhin A.A., Shershakova N.N., Kamyshnikov O.Y., et al. Adjuvant and adjuvant-free protocols produce similar phenotypes of allergic asthma in mice. *Curr Trends Immunol.* 2015; 16: 79–91.
23. Ennis D.P., Cassidy J.P., Mahon B.P. Acellular pertussis vaccine protects against exacerbation of allergic asthma due to *Bordetella pertussis* in a murine model. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12 (3): 409–417. doi: 10.1128/CDLI.12.3.409-417.2005.
24. Wenzel S.E., Schwartz L.B., Langmack E.L., Halliday J.L., et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160 (3): 1001–1008. doi: 10.1164/ajrccm.160.3.9812110.
25. Nakagome K., Matsushita S., Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. *International Archives of Allergy and Immunology.* 2012; 158: 96–102. doi: 10.1159/000337801.
26. Moore W.C., Hastie A.T., Li X., Li H., et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133 (6): 1557–1563. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.011.
27. Pichavant M., Goya S., Hamelmann E., Gelfand E.W. et al. Animal models of airway sensitization. *Curr Protoc Immunol.* 2007; 15 (15): 18. doi: 10.1002/0471142735.im1518s79.
28. Ito K., Herbert C., Siegle J.S., Vuppusetty C., et al. Steroid-resistant neutrophilic inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008; 39 (5): 543–550. doi: 10.1165/rcmb.2008-0028OC.
29. Woolley K.L., Gibson P.G., Carty K., Wilson A.J. et al. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154 (1): 237–243. doi: 10.1164/ajrccm.154.1.8680686.
30. Kato T., Takeda Y., Nakada T., Sendo F. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. *Nat Immun.* 1995; 14 (4): 198–208.
31. Bogaert P., Naessens T., de Koker S., Hennuy B., et al. Inflammatory signatures for eosinophilic vs. neutrophilic allergic pulmonary inflammation reveal critical regulatory checkpoints. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol.* 2011; 300 (5): 679–690. doi: 10.1152/ajplung.00202.2010.
32. Dejager L., Dendoncker K., Eggermont M., Souffriau J., et al. Neutralizing TNF $\alpha$  restores glucocorticoid sensitivity in a mouse model of neutrophilic airway inflammation. *Mucosal Immunol.* 2015; 8: 1–14. doi: 10.1038/mi.2015.12.
33. Knudsen N.P.H., Olsen A., Buonsanti C., Follmann F., et al. Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Sci Rep.* 2016; 6: 19570. doi: 10.1038/srep19570.
34. Gavino A.C., Nahmod K., Bharadwaj U., Makedonas G., et al. STAT3 inhibition prevents lung inflammation, remodeling, and accumulation of Th2 and Th17 cells in a murine asthma model. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2016; 71 (12): 1684–1692. doi: 10.1111/all.12937.
35. Xu L., Sun W.J., Jia A.J., Qiu L.L., et al. MBD2 regulates differentiation and function of Th17 cells in neutrophils-dominant asthma via HIF-1 $\alpha$ . *J Inflamm (United Kingdom).* 2018; 15 (1): 1–12. doi: 10.1186/s12950-018-0191-x.
36. An T.J., Rhee C.K., Kim J.H., Lee Y.R., et al. Effects of macrolide and corticosteroid in neutrophilic asthma mouse model. *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2018; 81 (1): 80–87. doi: 10.4046/trd.2017.0108.
37. Tan H.T.T., Hagner S., Ruchti F., Radzikowska U., et al. Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2019; 74 (2): 294–307. doi: 10.1111/all.13619.
38. Babakhin A.A., Laskin A.A., Nikonova A.A., Kamishnikov O.Yu., et al. Modelling of bronchial asthma with neutrophilic phenotype of inflammation. *Immunologiya.* 2017; 38 (4): 199–205. (in Russian)
39. Liu W., Liu S., Verma M., Zafar I., et al. Mechanism of TH2/TH17-predominant and neutrophilic TH2/TH17-low subtypes of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 139 (5): 1548–1558. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.032.
40. Morishima Y., Ano S., Ishii Y., Ohtsuka S., et al. Th17-associated cytokines as a therapeutic target for steroid-insensitive asthma. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 1–9. doi: 10.1155/2013/609395.

© Коллектив авторов, 2019

Кашутина М.И.<sup>1</sup>, Жернов Ю.В.<sup>2</sup>, Зубкова О.А.<sup>3</sup>, Порошина А.С.<sup>2</sup>,  
Кудлай Д.А.<sup>2</sup>, Григорьевский В.А.<sup>3</sup>, Хаитов М.Р.<sup>2</sup>

## Изучение эффективности применения биоаналога ритуксимаба (Реддитукс®) у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)», 119991, г. Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, 115522, г. Москва, Россия

<sup>3</sup> Филиал № 3 ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России, 143920, Московская область, г. Балашиха, Россия

### Резюме

Реддитукс® – противоопухолевое средство, представляющее собой моноклональное антитело против трансмембранного антигена CD20. Препарат зарегистрирован в Российской Федерации с 2016 г. Будучи наиболее дешевым биоаналогом лекарственных средств, содержащих ритуксимаб, включенных в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения, Реддитукс® может быть препаратом выбора при лечении пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) как в комплексной, так и в монотерапии. Работ, оценивающих опыт клинического применения Реддитукса® в Российской Федерации, не опубликовано. Нами проведено изучение эффективности применения препарата Реддитукс® у пациентов старше 35 лет с ДВККЛ при проведении иммунохимиотерапии в режиме R-СНОР. Группу сравнения составили пациенты, проходившие курс иммунохимиотерапии в режиме СНОР. Показано, что в группе, проходившей лечение в режиме R-СНОР (с включением препарата Реддитукс®), увеличились частота полных ремиссий, общая и бессобытийная выживаемость, снизилась смертность пациентов во время прохождения лечения, а также сократилось количество рецидивов. Кроме того, приведен клинический пример успешного применения R-СНОР-терапии с добавлением препарата Реддитукс®, позволившей добиться полной ремиссии заболевания, что подтверждено данными компьютерной томографии.

**Ключевые слова:** Реддитукс®; ритуксимаб; R-СНОР; иммунотерапия; иммунохимиотерапия; диффузная В-крупноклеточная лимфома

Статья поступила 02.08.2019. Принята в печать 16.10.2019.

**Для цитирования:** Кашутина М.И., Жернов Ю.В., Зубкова О.А., Порошина А.С., Кудлай Д.А., Григорьевский В.А., Хаитов М.Р. Изучение эффективности применения биоаналога ритуксимаба (Реддитукс®) у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Иммунология. 2019; 40 (6): 16–21. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16002

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Kashutina M.I.<sup>1</sup>, Zhernov Yu.V.<sup>2</sup>, Zubkova O.A.<sup>3</sup>, Poroshina A.S.<sup>2</sup>, Kudlay D.A.<sup>2</sup>,  
Grigoryevsky V.A.<sup>3</sup>, Khaitov M.R.<sup>2</sup>

## Effectiveness of rituximab biosimilar (Reddytux®) on the treatment of diffuse large B-cell lymphoma

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russia

<sup>2</sup> National Research Center – Institute of immunology of Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Branch # 3 Burdenko Main Military Clinical Hospital of Ministry of Defense of Russia, Russia, 143920, Moscow region, Balashikha, Russia

### Abstract

Reddytux® is an antitumor agent that is a monoclonal antibody against the CD20 transmembrane antigen. The drug is registered in Russian Federation since 2016. Reddytux® is the

Для корреспонденции  
Жернов Юрий Владимирович –  
доктор медицинских наук, доцент,  
заведующий лабораторией  
врожденного иммунитета  
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»  
ФМБА России,  
Москва, Россия  
E-mail: zhernov@list.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-8734-5527>

cheapest biosimilar drug containing rituximab, included in the list of vital and most important drugs for medical use. This means that it can be the best-choice medication in the treatment of patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in complex and monotherapy. No works evaluating the clinical experience of Reddytux® in Russian Federation have been published. We conducted a study on the effectiveness of the use of the Reddytux® (rituximab bioanalogue) in patients older than 35 years with DLBCL during immunochemotherapy in the R-CHOP mode. As a control was taken a group of patients who underwent a course of immunochemotherapy in the CHOP mode. It was shown that in the group treated in the R-CHOP regimen (with the inclusion of the Reddytux® preparation), the frequency of complete remissions increased, the overall and event-free survival rate, the mortality of patients during treatment decreased, and the number of relapses decreased. In addition, a clinical example of the successful use of R-CHOP therapy with the addition of the Reddytux® preparation is given, which made it possible to achieve complete remission of the disease, confirmed by CT data.

**Keywords:** Reddytux®; rituximab; R-CHOP; immunotherapy; immunochemotherapy; diffuse large B-cell lymphoma

**Received** 02.08.2019. **Accepted** 16.10.2019.

**For citation:** Kashutina M.I., Zhernov Yu.V., Zubkova O.A., Poroshina A.S., Kudlay D.A., Grigoryevsky V.A., Khaïtov M.R. Effectiveness of rituximab biosimilar (Reddytux®) on the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 16–21. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16002

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

**For correspondence**

Zhernov Yury V. – MD, PhD,  
Associate Professor,  
Head of Laboratory of Innate Immunity  
NRC Institute of Immunology  
FMBA of Russia,  
Moscow, Russia  
E-mail: zhernov@list.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-8734-5527>

## Введение

Последние годы отмечены рядом важнейших открытий в сфере онкогематологии. Неизлечимые ранее быстропрогрессирующие заболевания, такие, например, как диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ), стали поддаваться иммунотерапии. В ответ на потребность в новых, более эффективных схемах лечения, были разработаны таргетные методы иммунохимиотерапии, основанные на использовании моноклональных антител. Так, применение моноклонального антитела против CD20 (ритуксимаб) совместно со стандартными дозами циклофосфида, доксорубина, винкристина и преднизолона (R-CHOP) позволило достичь более высокой эффективности, беспрогрессивной и общей выживаемости у пациентов с диффузной ДВККЛ [1, 2, 7–10].

ДВККЛ – это наиболее часто встречающийся вариант агрессивных неходжкинских лимфом и представляет собой опухоль, при которой наблюдается диффузный рост с инфильтрацией лимфоузлов и/или нелимфатических органов и тканей крупными лимфоидными В-клетками. ДВККЛ характеризуется агрессивным клиническим течением со склонностью к быстрому росту и раннему прогрессированию, а также высокой чувствительностью к иммунохимиотерапии [3–6]. Диагностика ДВККЛ основывается на взятии биопсийного материала из пораженного лимфоузла или органа с последующим проведением иммуногистохимического анализа и иммунофенотипирования. Также диагностическое значение имеет определение уровней лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и мочевой кислоты [7, 8].

В апреле 2016 г. Минздравом России был зарегистрирован биоаналог ритуксимаба Реддитукс® (Reddytux®). Регистрационное удостоверение № ЛП-003584 выдано

компании «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия. Упаковщиком и фасовщиком данного препарата в России является АО «Р-Фарм», г. Ярославль. Реддитукс® по качеству, биологическому действию, безопасности и эффективности соответствует препарату Мабтера® («Ф.Хоффманн-Ля Рош, Лтд.», Швейцария), который занимает первое место по объему продаж в России (более 8,5 млрд руб. в год) среди препаратов, содержащих ритуксимаб.

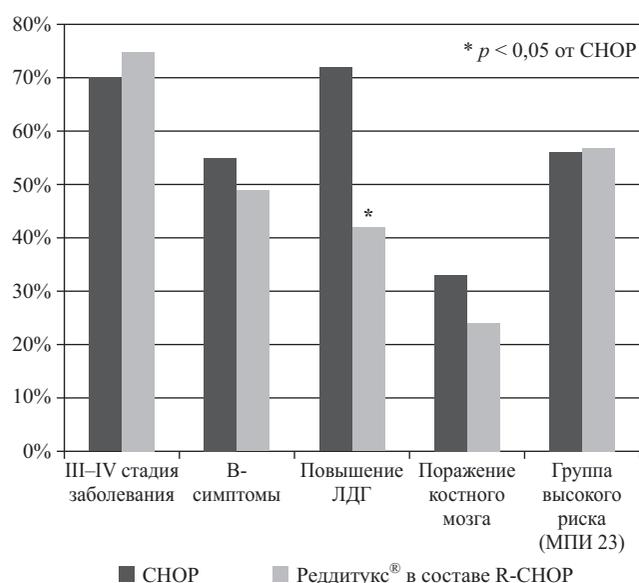
Так как ритуксимаб – лекарственный препарат, который входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения (ЖНВЛП) по состоянию на 2019 г. и государство берет на себя финансовую ответственность за обеспечение им пациентов, нельзя не отметить экономическую выгоду препарата Реддитукс®. По данным регистра лекарственных средств, для препарата «Ритуксимаб» установлена цена производителя на уровне 21800 рублей (лекарственный препарат в форме концентрата для приготовления раствора для инфузий с концентрацией действующего вещества ритуксимаба 10 мг/мл объемом 10 мл, количество в упаковке – 2 шт.), тогда как рыночная стоимость препарата Реддитукс® в той же концентрации начинается в среднем от 2800–3000 рублей за 10 мл. Рыночная стоимость препарата Реддитукс® почти в два раза ниже, чем у препарата Мабтера® в той же концентрации.

**Цели** данной работы – изучение эффективности применения препарата Реддитукс® в составе режима иммунохимиотерапии R-CHOP у пациентов с ДВККЛ, а также прогнозирование течения данного заболевания на основе анализа клинической эффективности режимов иммунохимиотерапии с включением и без включения Реддитукса® и оценке факторов прогноза заболевания.

## Материал и методы

**Характеристика пациентов.** Работа проводилась на базе отделения гематологии филиала № 3 ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России. В исследование было включено 38 пациентов (23 мужчины и 15 женщин) в возрасте 35–68 лет, страдающих ДВККЛ. Основная группа включала 19 пациентов (12 мужчин, 7 женщин). Пациентам была назначена иммунохимиотерапия в режиме R-СНОР (Реддитукс® совместно со стандартными дозами циклофосфида, доксорубицина, винкристина и преднизолона). Группа сравнения включала 19 пациентов (11 мужчин; 8 женщин), проходивших курс иммунохимиотерапии в режиме СНОР (стандартные дозы циклофосфида, доксорубицина, винкристина и преднизолона).

**Диагностика ДВККЛ.** Обязательный комплекс обследования пациентов включал сбор жалоб, анамнеза, объективный осмотр, лабораторные методы исследования: общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимические тесты (общий белок, АЛТ, АСТ, протромбиновый индекс, СРБ, фибриноген, ЛДГ, щелочная фосфатаза) для определения активности опухолевого процесса. Всем пациентам проводили ультразвуковое исследование (УЗИ) органов грудной клетки и брюшной полости, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, компьютерную томографию (КТ) малого таза, забрюшинного пространства, брюшной полости и грудной клетки. Магнитно-резонансная томография (МРТ) выполнялась по показаниям. Проводили обязательное исследование пункции костного мозга с подсчетом миелограммы и гистологическое исследование трепанобиоптата. Точный диагноз устанавливали на основании гистологического исследования биоптата лимфатических узлов и иммуногистохимического исследования, а также иммунофенотипирования периферической крови.



**Рис. 1.** Клинические данные и характеристика пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой в начале исследования

Первичный очаг опухолевого роста у пациентов исследуемой группы располагался в лимфатических узлах средостения, в подмышечных и шейных лимфатических узлах. Распределение по стадиям проводилось в соответствии с международным прогностическим индексом (МПИ) по системе Ann Arbo в модификации Cotswold. Результаты лечения оценивали в соответствии с международными критериями ответа опухоли на лечение.

Эффективность терапии оценивали после 2, 4 и 6 циклов иммунохимиотерапии. Не ответившими на лечение считались пациенты, которые не достигли полной или частичной ремиссии после 4-х циклов терапии, а также пациенты с признаками прогрессии на любом этапе лечения. Для оценки использовали критерии ответа на проводимое лечение по Cheson (в пересмотре 2007 г.) Отрицательный результат позитронно-эмиссионной КТ являлся ключевым фактором для документированного подтверждения полной (метаболической) ремиссии и был особенно важен для пациентов с остаточными опухолевыми массами по данным КТ. Результаты КТ позволили дать оценку ответа на лечение [6, 9].

Уровень значимости различий между параметрами 2 режимов иммунохимиотерапии оценивали по расчетному критерию  $\chi^2$  Пирсона.

## Результаты

Нами проанализированы клинические данные пациентов с ДВККЛ, часть из них проходила курсы иммунохимиотерапии в режиме СНОР, другая – в режиме R-СНОР, включавшем Реддитукс® (рис. 1).

Среди пациентов, получавших Реддитукс®, медиана возраста на момент начала лечения составила 45 лет (разброс от 35 до 68 лет). В группе пациентов, получавших лечение по протоколу СНОР без ритуксимаба и его биоаналогов, медиана составила 45 лет (разброс от 35 до 68 лет). Старше 60 лет было 21 и 19% пациентов соответственно. В обеих группах у большинства пациентов была диагностирована III–IV стадия заболевания: у 75% пациентов, получавших терапию в режиме R-СНОР, и у 70% пациентов, получавших терапию в режиме СНОР. МПИ определен у 57% пациентов, получавших Реддитукс® (R-СНОР), и у 56% пациентов, получавших терапию в режиме СНОР. К группе промежуточного высокого и высокого риска (МПИ ≥ 3) были отнесены 57% пациентов, получавших терапию с включением Реддитукса® (R-СНОР) и 56% пациентов, получавших терапию в режиме СНОР.

Установлено, что применение Реддитукса® в составе R-СНОР-терапии позволило повысить частоту полных ремиссий у больных с ДВККЛ на 19% (рис. 2).

Среди пациентов, получавших лечение Реддитуксом® в составе R-СНОР-режима, рефрактерных к терапии было на 9% меньше по сравнению со стандартной схемой ( $p = 0,079$ ). Случаев рецидивов заболевания наблюдалось на 13% меньше ( $p = 0,018$ ). Летальных исходов не наблюдалось во время лечения по обоим про-

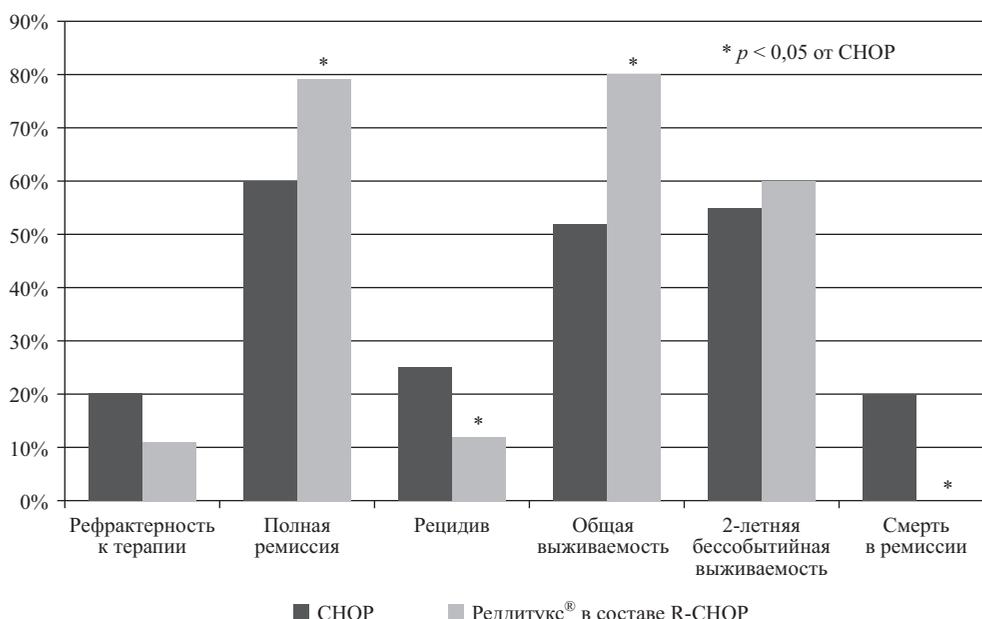


Рис. 2. Сравнение эффективности протоколов лечения диффузной В-крупноклеточной лимфомы

токолам. Из-за различных причин в ремиссии умерли 20% пациентов, получавших иммунохимиотерапию по схеме CHOP. Включение Реддитукса® в схему лечения привело к снижению летальных случаев у пациентов в ремиссии до нуля. Общая выживаемость пациентов, находящихся на паллиативной химиотерапии по схеме CHOP, составила 52%, а бессобытийная выживаемость – 20% при медиане наблюдения 5 лет. Общая выживаемость пациентов, принимающих дополнительно Реддитукс®, выросла до 80%, а бессобытийная выживаемость – до 60% при медиане наблюдения 3,5 года ( $p < 0,001$ ).

Нами проанализировано влияние на выживаемость и прогноз таких признаков, как поражение костного мозга, наличие В-симптомов, повышение уровня ЛДГ в периферической крови, возраст, МПИ и наличие симптомов интоксикации по обоим протоколам. По итогам анализа двухлетняя бессобытийная выживаемость несколько выше у пациентов в возрасте до 60 лет, 60% для реципиентов Реддитукса® в составе R-CHOP и 55% для реципиентов CHOP-режима иммунохимиотерапии. Пол пациентов, поражения костного мозга, наличие В-симптомов, повышенный уровень ЛДГ в крови не имели прогностической значимости в отношении бессобытийной выживаемости больных. На прогноз и выживаемость пациентов с ДВККЛ достоверно влияла величина МПИ. Двухлетняя бессобытийная выживаемость значительно хуже при МПИ, равном 4–5 (39%), в то время как при величине МПИ от 0 до 1 она составила 96%.

Гематологическая токсичность от паллиативной иммунохимиотерапии высокой степени наблюдалась достаточно редко, с одинаковой частотой вне зависимости от применяемого режима иммунохимиотерапии (рис. 3).

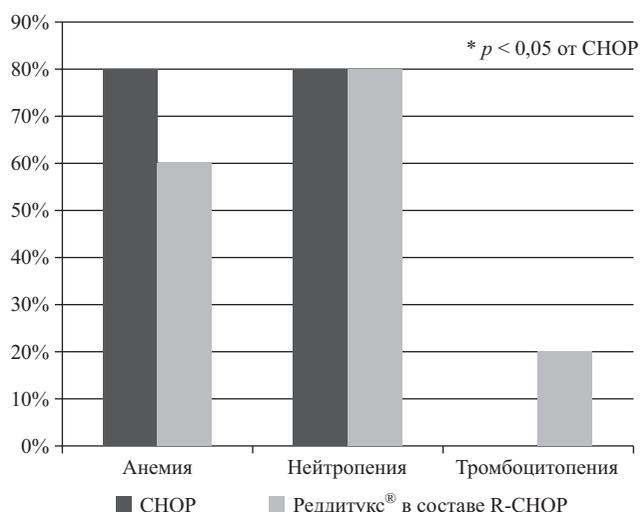


Рис. 3. Гематоксические осложнения лечения диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Основным токсическим осложнением лечения ДВККЛ стал острый инфекционный процесс (до 19% случаев), который развивался с одинаковой частотой как у пациентов из основной группы, так и из группы сравнения. Установлено, что включение Реддитукса® в схему лечения достоверно снижало тошноту и рвоту у пациентов по сравнению с CHOP-режимом иммунохимиотерапии ( $p = 0,027$ ) (рис. 4).

### Клинический случай

Пациентка А., 39 лет, вес – 39 кг, рост – 150 см. Диагноз: неходжкинская лимфома, В-крупноклеточная форма, IV стадия. Реактивный гепатит.

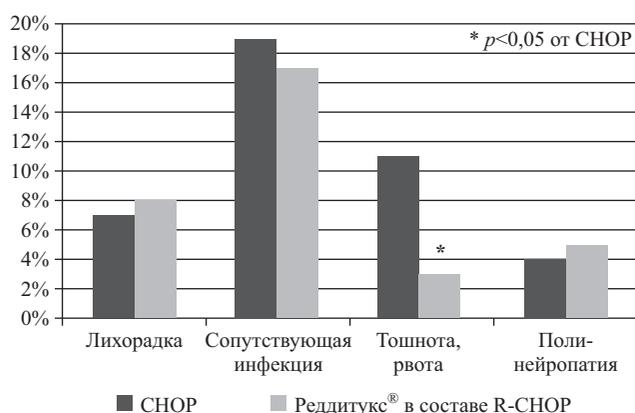


Рис. 4. Общетоксические осложнения лечения диффузной В-крупноклеточной лимфомы

#### Анамнез заболевания

В начале мая 2014 г. появились боли в эпигастрии с иррадиацией в поясничную область и левую половину грудной клетки. В стационар поступила в состоянии средней степени тяжести, с выраженными болевым синдромом, опухолевой интоксикацией, В-симптомами.

#### Данные инструментальных методов исследования на момент поступления

По данным УЗИ: в паренхиме селезенки образование размером 12 мм, в воротах селезенки обнаружено образование размером 17×25 мм. В воротах печени, гепатодуоденальной связке и забрюшинном пространстве – множественные лимфоузлы, расположенные группами и конгломератами, размером 17, 32 и 45 мм. В эпигастриальной области многоузловое образование размером 82×45×55 мм, а также множественные лимфоузлы размером 6–8 мм в области поджелудочной железы.

По данным КТ на момент поступления в стационар: в средней трети селезенки – образование 11 мм. В проекции аорты и крупных ветвей чревного ствола объемное образование (конгломерат из лимфоузлов) размером 100×90×80 мм.

Пункционная биопсия опухолевидного образования брюшной полости с последующим иммуногистохимическим исследованием подтвердила диагноз ДВККЛ.

#### Литература

1. Coiffier B., Lepage E., Briere J. et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 235–242.
2. Pfreundschuh M., Trümper L., Osterborg A. et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: A randomized controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006; 7 (5): 379–391.

#### Курс терапии

Пациентке проведено 5 курсов иммунохимиотерапии с применением Реддитукса® в составе R-CHOP. По окончании 5-го курса по данным КТ и УЗИ наблюдалась частичная ремиссия заболевания. Учитывая хороший ответ на проводимое лечение, в дальнейшем было назначено еще 12 курсов монотерапии Реддитуксом®.

#### Контрольное обследование по окончании лечения (рестадирование)

После введения последнего 17-го курса иммунохимиотерапии (февраль 2018 г.) у пациентки по данным КТ и УЗИ средостения и брюшной полости патологии не выявлено. Наблюдалась полная ремиссия заболевания.

#### Заключение

Таким образом, на примере отделения гематологии филиала № 3 ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России показана эффективность применения препарата Реддитукс® (зарегистрированного в Российской Федерации биоаналога ритуксимаба) в составе R-CHOP-режима иммунохимиотерапии у пациентов старше 35 лет с ДВККЛ. Его применение повышает частоту полных ремиссий, снижает рецидивы заболевания, уменьшает смертность пациентов во время лечения, а также увеличивает показатели выживаемости пациентов по сравнению с обычной CHOP-иммунохимиотерапией. Реддитукс® – наиболее дешевый биоаналог лекарственных средств, содержащих ритуксимаб, включенных в Реестр жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, он может быть препаратом выбора при лечении больных ДВККЛ как в комплексной, так и в монотерапии. Однако для подтверждения полученных результатов необходимо проведение дальнейших более масштабных рандомизированных проспективных исследований.

**Вклад авторов.** Концепция и дизайн исследования – Григорьевский В.А. Сбор и обработка материала – Зубкова О.А. Статистическая обработка – Зубкова О.А., Жернов Ю.В. Написание текста – Жернов Ю.В., Порошина А.С., Кашутина М.И. Редактирование – Жернов Ю.В., Порошина А.С., Кашутина М.И. Окончательный вариант и целостность – Кудлай Д.А., Хаитов М.Р.

3. Вернюк М.А., Тюрина Н.Г., Павлова О.А. и др. Опыт лечения первичной медиастиальной В-крупноклеточной лимфомы. *Онкогематология.* 2013; 4: 18–23.
4. Hernandez-Ilizaliturri F.J., Czuczman M.S. Therapeutic options in relapsed or refractory diffuse large b-cell lymphoma: part 1. Current treatment approaches. *Oncology.* 2009; 23 (6): 546–553.
5. Zhou Z., Sehn L.H., Rademaker A.W. et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood.* 2014; 123 (6): 837–842.

6. Гематология: национальное руководство / под ред. О.А. Руквиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015: 423–438.

7. Мационис А.Э., Повилайтите П.Е., Петров А.В. Молекулярно-генетическое исследование клональности В- и Т-лимфоцитов в диагностике неходжкинских лимфом. Архив патологии. 2012; 4: 57–62.

8. Sidorova Yu.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Sudarikov A.B. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and

paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. Exp. Dermatol. 2012; 21 (1): 57–60.

9. Магомедова А.У., Воробьев А.И. Международный прогностический индекс при диффузной В-крупноклеточной лимфосаркоме. Терапевтический архив. 2008; 80 (3): 71–6.

10. Авдеева Ж.И., Солдагов А.А., Киселевский М.В., Медуницын Н.В. Противоопухолевые моноклональные антитела. Иммунология. 2017; 38 (5): 256–270.

## ■ References

1. Coiffier B., Lepage E., Briere J., et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2002; 346: 235–42.

2. Pfreundschuh M., Trümper L., Osterborg A., et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: A randomized controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. Lancet Oncol. 2006; 7 (5): 379–91.

3. Vernyuk M.A., Tyurina N.G., Pavlova O.A., et al. Experience in the treatment of primary mediastinal B-large cell lymphoma. Oncohematology. 2013; 4: 18–23. (in Russian).

4. Hernandez-Ilizaliturri F.J., Czuczman M.S. Therapeutic options in relapsed or refractory diffuse large b-cell lymphoma: part 1. Current treatment approaches. Oncology. 2009; 23 (6): 546–53.

5. Zhou Z., Sehn L.H., Rademaker A.W., et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large

B-cell lymphoma treated in the rituximab era. Blood. 2014; 123 (6): 837–42.

6. Rukavitsyna O.A., et al. Hematology: national leadership. Moscow: GEOTAR-Media; 2015: 423–38. (in Russian)

7. Matsionis A.E., Povilajtite P.E., Petrov A.V. Molecular genetic study of the clonality of B- and T-lymphocytes in the diagnosis of non-Hodgkin lymphomas. Archive pathology. 2012; 4: 57–62. (in Russian)

8. Sidorova Yu.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Sudarikov A.B. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. Exp Dermatol. 2012; 21 (1): 57–60.

9. Magomedova A.U., Vorobev A.I. International prognostic index for diffuse B-large cell lymphosarcoma. Therapeutic archive. 2008; 80 (3): 71–6. (in Russian).

10. Avdeeva Zh.I., Soldatov A.A., Kiselevskiy M.V., Medunitsyn N.V. Antitumor monoclonal antibodies. Immunologiya. 2017; 38 (5): 256–270.

© Коллектив авторов, 2019

Килина Д.А.<sup>1</sup>, Карнишкина О.Ю.<sup>1</sup>, Смирнова Т.С.<sup>2</sup>, Галимова Э.С.<sup>1,3</sup>

## Генетические маркеры ответа на терапию циклоспорином у больных псориазом

<sup>1</sup> Центр доклинических и трансляционных исследований, Институт экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> СПбГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер», 192102, г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук (ИЭФБ РАН), 194223, г. Санкт-Петербург, Россия

### Резюме

**Цель** исследования – анализ ассоциаций полиморфных вариантов rs3213619, rs2229109, rs1128503, rs2032582 гена *ABCB1* с чувствительностью к терапии циклоспорином в популяции русских. Использованы образцы ДНК 168 больных псориазом русской этнической принадлежности. Генотипирование полиморфных локусов rs3213619, rs2229109, rs1128503, rs2032582 *ABCB1* гена проведено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием амплификатора CFX 96™ Real-Time Cycler (BioRad, США). Впервые была обнаружена ассоциация rs1045642 с риском развития негативных реакций и отсутствием эффективности терапии циклоспорином у больных псориазом (отношение шансов 2,58, 95% доверительный интервал 1,64–4,06). Для подтверждения полученных результатов необходимы репликативные исследования на независимых выборках в различных популяциях.

**Ключевые слова:** фармакогенетика; персонализированная терапия; псориаз; ген *ABCB1*; P-гликопротеин; полиморфные варианты; ассоциация

Статья поступила 11.08.2019. Принята в печать 16.10.2019.

**Для цитирования:** Килина Д.А., Карнишкина О.Ю., Смирнова Т.С., Галимова Э.С. Генетические маркеры ответа на терапию циклоспорином у больных псориазом. Иммунология. 2019; 40 (6): 22–25. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16003

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке госконтракта № П011.0701 от 17.04.2018, а также в рамках гранта Евросоюза – Европейского фонда регионального развития.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции  
Галимова Эльвира Сафуановна –  
кандидат биологических наук,  
Центр доклинических  
и трансляционных исследований,  
Институт экспериментальной  
медицины  
ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр  
им. В.А. Алмазова»  
Минздрава России,  
Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: elya-4@yandex.ru  
<http://orcid.org/0000-0002-8773-0932>

Kilina D.A.<sup>1</sup>, Karnishkina O.Yu.<sup>1</sup>, Smirnova T.S.<sup>2</sup>, Galimova E.S.<sup>1,3</sup>

## Genetic markers of response to cyclosporine treatment in psoriasis patients

<sup>1</sup> Center for Preclinical and Translational Research, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 197341, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> City Skin and Venereal Clinic, 192102, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry named after I.M. Sechenov, Russian Academy of Sciences, 194223, Saint Petersburg, Russia

### Abstract

**The aim** of the present study was to assess the association rs3213619, rs2229109, rs1128503, rs2032582 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *ABCB1* gene with response to cyclosporine treatment in Russian patients with psoriasis. DNA samples were collected from 168 patients with psoriasis. Genotyping of rs3213619, rs2229109, rs1128503, rs2032582 SNPs in the *ABCB1* gene was performed by real-time polymerase chain reaction using the CFX 96™ Real-Time Cycler (BioRad, USA). The variant rs1045642 in the *ABCB1* gene showed an association with a negative response to cyclosporine therapy (OR = 2.58, 95% CI = 1.64–4.06). Further, larger studies are required to confirm our findings and replicate them in various populations.

For correspondence  
Galimova Elvira S. – PhD,  
Center for Preclinical  
and Translational Research,  
Institute of Experimental Medicine,  
Almazov National Medical  
Research Center,  
Ministry of Healthcare  
of the Russian Federation,  
Saint Petersburg, Russia  
E-mail: elya-4@yandex.ru  
<http://orcid.org/0000-0002-8773-0932>

**Keywords:** pharmacogenetics; psoriasis; *ABCBI* gene; P-glycoprotein; polymorphic variants; association

**Received** 11.08.2019. **Accepted** 16.10.2019.

**For citation:** Kilina D.A., Karnishkina O.Yu., Smirnova T.S., Galimova E.S. Genetic markers of response to cyclosporine treatment in psoriasis patients. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 22–5. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16003

**Funding.** The study was carried out with the support of state contract no. P011. 0701 dated 17.04.2018, as well as within the framework of a grant from the European Union – the European regional development fund.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

Псориаз – хроническое воспалительное заболевание кожи, характеризующееся гиперпролиферацией эпидермальных клеток, нарушением кератинизации, воспалительной реакцией в дерме. Для лечения псориаза различной степени тяжести применяют фототерапию, глюкокортикоиды, аналоги витаминов А и D, иммунодепрессанты и генно-инженерные биологические препараты.

Циклоспорин – иммуносупрессивный препарат, представляющий собой циклический липофильный полипептид из 11 аминокислот. Основными клетками-мишенями для циклоспорина являются CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоциты, активация которых лежит в основе развития иммунного ответа при псориазе. Циклоспорин на клеточном уровне блокирует покоящиеся лимфоциты в фазах клеточного цикла G<sub>0</sub> или G<sub>1</sub>, подавляет продукцию и секрецию цитокинов активированными Т-лимфоцитами.

Разработка и внедрение методов, позволяющих персонализировать фармакотерапию, – одна из приоритетных задач медицины, поскольку это связано с недостаточной безопасностью и эффективностью лекарственных средств. Так, по данным исследований, у 10–40% пациентов применение лекарственных препаратов оказывается неэффективным [1]. Ежегодно в США умирают около 100 тыс. человек и более 2 млн госпитализируют по поводу нежелательных лекарственных реакций (НЛР) [1]. В развитие НЛР и неэффективности лекарственной терапии существенный вклад вносят генетические факторы. Циклоспорин наиболее эффективен в лечении тяжелых форм псориаза и псориатического артрита. Однако отмечено, что в отдельных случаях применение этого препарата приводит к тяжелым токсическим повреждениям почек, интенсивным болям в костях и снижению эффективности [2].

**Цель** исследования – оценить влияние полиморфных вариантов rs3213619, rs2229109, rs1128503, rs2032582 и rs1045642 гена *ABCBI*, кодирующего Р-гликопротеин – АТФ-связывающий кассетный транспортер, осуществляющий энергозависимый перенос субстратов через мембрану, на эффективность терапии циклоспорином у больных псориазом русской этнической принадлежности.

## Материал и методы

В работе использованы образцы ДНК 168 больных псориазом, состоящих на учете и находящихся на ста-

ционарном лечении в городских кожно-венерологических диспансерах Москвы и Санкт-Петербурга. Тяжесть и активность болезни, а также чувствительность к терапии циклоспорином после 3 мес оценивали по индексу площади и тяжести псориатических поражений PASI (Psoriasis Area and Severity Index). В группе пациентов, получавших циклоспорин, оценку эффективности терапии проводили после трех месяцев лечения. Достижение величины индекса PASI > 75% расценивалось как выраженная клиническая эффективность терапии псориаза, тогда как при индексе PASI ≤ 50% – как отсутствие чувствительности к лечению. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [3]. Генотипирование пяти однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) гена *ABCBI* (табл. 1) было проведено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием амплификатора CFX 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Соответствие наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению по закону Харди–Вайнберга оценивали с помощью точного критерия Фишера [4] в программе FINNETI. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ PLINK [5], FINNETI и MS Excel 2013 (Microsoft). При сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и здоровых лиц применяли критерий  $\chi^2$ , точный критерий Фишера и критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса для таблиц сопряженности 2 × 2. Силу ассоциаций генотипических характеристик с риском развития псориаза оценивали по значениям показателя отношения шансов (ОШ, odds ratio, OR). Для коррекции множественных сравнений применяли поправку Бонферрони.

## Результаты и обсуждение

С учетом оценки PASI после трех месяцев терапии циклоспорином 104 больных псориазом были идентифицированы как чувствительные к лечению PASI > 75%, тогда как 64 пациента с PASI ≤ 50% – без эффективности терапии. При анализе распределения частот моделей наследования полиморфных вариантов SNPs rs3213619, rs2229109, rs1128503, rs2032582 гена *ABCBI* у больных псориазом с клинической эффективностью терапии и у пациентов без улучшений не было выявлено достоверных отличий ( $p > 0,05$ ). Показано, что частота редкого аллеля T (0,58) генетического варианта C3435T

Таблица 1. Полиморфизмы, последовательности праймеров и номенклатура аллелей анализируемых маркеров гена *ABCB1*

Ген	Полиморфизм	Последовательность праймеров
<i>ABCB1</i>	<i>T-129C</i> (rs3213619)	5'-ATTGGCTGGGCAGGAACA-3' 5'-TTTGAAGATACTCCGAC-3'
	<i>G1199A</i> (rs2229109)	5'-CAGCTATTCGAAGAGTGGGC-3' 5'-CCGTGAGAAAAAACTTCAAGG-3'
	<i>C1236T</i> (rs1128503)	5'-TCTTTGTCACTTTATCCAGC-3' 5'-TCTCACCATCCCCCTCTGT-3'
	<i>G2677T</i> (rs2032582)	5'-TGCAGGCTATAGGTTCCAGG-3' 5'-TTTAGTTTGACTCACCTTCCCG-3'
	<i>C3435T</i> (rs1045642)	5'-TAGGCCAGAGAGGCTGCC-3' 5'-AGTGGCTCCGAGCACACC30-3'

*ABCB1* была значительно выше в группе больных псориазом, демонстрирующих неэффективность терапии циклоспорином, по сравнению с противоположной когортой (0,28) (табл. 2). Таким образом, было обнаружено, что носительство аллеля *T* rs1045642 повышает риск развития негативных реакций и отсутствия эффективности терапии циклоспорином у больных псориазом (ОШ 2,58; 95% ДИ 1,64 – 4,06). Вышеуказанная ассоциация остается статистически значимой и после введения поправки Бонферрони на множественные сравнения. Кроме того, анализ ассоциаций моделей наследования полиморфного варианта *C3435T* (rs1045642) гена *ABCB1* у больных псориазом с эффективной терапией циклоспорином выявил, что при доминантной модели наследования (*TT+CT* vs *CC*) повышен риск развития негативных реакций и отсутствия эффективности терапии циклоспорином у больных псориазом (ОШ 4,01; 95% ДИ 1,82 – 8,98) в 2 раза в сравнении с рецессивной моделью (*TT* vs *CC+CT*) (ОШ 2,50; 95% ДИ 1,14–5,50) (см. табл. 2).

Согласно результатам многочисленных исследований, ответы на лекарственное воздействие варьируют у представителей различных этнических групп [6]. Ведущая роль генетических факторов в развитии НЛР предполагает, что в основе возникновения вариаций при ответе на фармакотерапию лежат генетические межпопуляционные различия. Наиболее ранняя работа,

оценивающая межэтнические различия в частотах аллелей и генотипов полиморфных маркеров гена *ABCB1*, связана с анализом полиморфизма данного гена в европейских популяциях и далее – в популяциях других регионов [6]. В исследовании 84 пациентов с псориазом в греческой популяции в течение 3-месячного периода лечения циклоспорином А выявлена статистически значимая ассоциация SNP rs1045642 в гене *ABCB1* с неэффективностью терапии ( $p = 0,0075$ ) [7], что согласуется с результатами данного исследования, полученными для русской популяции.

Ген *ABCB1* кодирует Р-гликопротеин (MDR1 multidrug resistance protein 1 – белок множественной лекарственной устойчивости 1; CD243) – это представитель суперсемейства ABC-транспортеров, участвующий в переносе ксенобиотиков [8]. Ген *ABCB1* размером 100 kb картирован на хромосоме 7, локус 21.1 и содержит 28 экзонов. Ген является высокополиморфным и в настоящий момент идентифицировано более 8000 SNPs, из которых 390 расположено в кодирующих регионах [9]. Наиболее изучены три SNPs гена *ABCB1* – 1236C>T, 2677G>T/A и 3435C>T. Полиморфный вариант 3435C>T локализован в 26 экзоне и является синонимичной заменой I (Ile) > I (Ile). Исследования выявили, что этот синонимичный полиморфизм может изменять уровень Р-гликопротеина путем влияния на экспрессию мРНК, альтернативный сплайсинг и эффек-

Таблица 2. Результаты анализа ассоциаций полиморфного локуса rs1045642 гена *ABCB1* у больных псориазом с эффективностью терапии циклоспорином

Модель наследования	Частота у больных с PASI 50 $p$ (%), $n = 64$	Частота у больных с PASI 75 $p$ (%), $n = 104$	$\chi^2$ ( $p$ -value)	ОШ (95% ДИ)
Аллельная модель <i>T</i> vs <i>C</i>	74/54 (57,8/42,1)	72/136 (28,4/71,5)	17,35 (0,00003)	2,58 (1,64–4,07)
Кодоминантная модель наследования <i>TT</i> vs <i>CT</i> vs <i>CC</i>	22/30/12 (34,3/46,8/18,7)	18/36/50 (17,3/34,6/48)	15,6 (0,0004)	–
Доминантная модель наследования <i>TT+CT</i> vs <i>CC</i>	52/12 (81,2/18,7)	54/50 (51,9/48,0)	14,6 (0,00013)	4,01 (1,82–8,98)
Рецессивная модель наследования <i>TT</i> vs <i>CC+CT</i>	22/42 (34,3/65,6)	18/86 (17,3/82,7)	5,45 (0,02)	2,50 (1,14–5,50)

**Примечание.**  $n$  – численность групп;  $p$  – частота генотипа (аллеля, модели наследования);  $\chi^2$  ( $p$ ) – оценка достоверности различий по распределению частот генотипов между двумя группами; ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал; жирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

тивность трансляции [10, 11]. Этот SNP демонстрирует выраженную межэтническую вариабельность [12]. Частоты распространенности аллеля *3435T* составляют 0,17–0,27 у африканцев, 0,41–0,66 у азиатов и 0,48–0,57 у европейцев [13–17]. Варианты гена *ABCB1* ассоциируют с изменениями в фармакокинетике лекарственных препаратов, с эффективностью лечения и развитием нежелательных реакций.

У носителей аллеля *T* rs1045642 повышен риск развития побочных эффектов в результате низкой экспрессии гена *ABCB1*, влияющей на снижение количества Р-гликопротеина в кишечнике, печени, почках и эндотелии гемато-энцефалического барьера. Это, в свою очередь, требует снижения дозы препарата, являющегося субстратом Р-гликопротеина, с узким терапевтическим диапазоном (например, циклоспорина, дигоксина, такролимуса и др).

В результате данного исследования впервые идентифицирован фармакогенетический маркер эффективности терапии циклоспорином у больных псориазом русской этнической принадлежности, что является предпосылкой для разработки и внедрения в практику персонализированного подхода к иммуносупрессивной терапии.

### Заключение

Полиморфный вариант rs1045642 гена *ABCB1* ассоциирован с отсутствием эффективности лечения циклоспорином и повышенным риском возникновения нежелательных реакций у больных псориазом русской этнической принадлежности. Для подтверждения результатов настоящего исследования необходимы репликативные исследования на независимых выборках в различных популяциях.

### Литература/References

1. Silber B.M. Pharmacogenomics. In: W. Kalow, U. Meyer, R.F. Tyndale (eds). New York, NY: Marcel Dekker, 2001.
2. O'Neil E.A., Sloan V.S. A potential mechanism of cyclosporine-associated bone pain: comment on the radiologic vignette by Stone et al. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 565–6.
3. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. *Methods Mol. Biol.* 1985; 2: 31–4.
4. Guo S.W., Thompson E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics.* 1992; 48 (2): 361–72.
5. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 81 (3): 559–75.
6. Wolking S., Schaeffeler E., Lerche H., Schwab M., Nies A.T. Impact of genetic polymorphisms of *ABCB1* (*MDR1*, P-glycoprotein) on drug disposition and potential clinical implications: update of the literature. *Clin Pharmacokinet.* 2015; 54 (7): 709–35.
7. Vasilopoulos Y., Sarri C., Zafriou E., Patsatsi A., Stamatidis C., Ntoumou E., et al. A pharmacogenetic study of *ABCB1* polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. *Pharmacogenomics J.* 2014; 14 (6): 523–25.
8. Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett* 2006; 234: 4–33.
9. NCBI's dbSNP database.
10. Wang D., Johnson A.D., Papp A.C., Kroetz D.L., Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (*MDR1*, *ABCB1*) variant 3435C4T affects mRNA stability. *Pharmacogenet. Genomics* 2005; 15: 693–704.
11. Lindell M., Karlsson M.O., Lennernas H., Pahlman L., Lang M.A. Variable expression of *CYP* and *Pgp* genes in the human small intestine. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003; 33: 493–9.
12. Fung K.L., Gottesman M.M. A synonymous polymorphism in a common *MDR1* (*ABCB1*) haplotype shapes protein function. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1794: 860–71.
13. Ameyaw M.M., Regateiro F., Li T., Liu X., Tariq M., Mobarek A., et al. *MDR1* pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics.* 2001; 11: 217–21.
14. Cascorbi I., Gerloff T., John A., Meisel C., Hoffmeyer S., Schwab M., et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter *MDR1* gene in white subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001; 69: 169–74.
15. Kim R.B., Leake B.F., Choo E.F., Dresser G.K., Kubba S.V., Schwarz U.I., et al. Identification of functionally variant *MDR1* alleles among European Americans and African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001; 70: 189–99.
16. Lee S.S., Kim S.-Y., Kim W.-Y., Thi-Le H., Yoon Y.-R., Yea S.S., et al. *MDR1* genetic polymorphisms and comparison of *MDR1* haplotype profiles in Korean and Vietnamese populations. *Ther. Drug Monit.* 2005; 27: 531–5.
17. Schaeffeler E., Eichelbaum M., Brinkmann U., Penger A., Asante-Poku S., Zanger U.M., et al. Frequency of C3435T polymorphism of *MDR1* gene in African people. *Lancet.* 2001; 358: 383–4.

© Коллектив авторов, 2019

Артемьева К.А.<sup>1</sup>, Богданова И.М.<sup>1</sup>, Степанова И.И.<sup>1</sup>, Болтовская М.Н.<sup>1</sup>,  
Калюжин О.В.<sup>2</sup>, Степанов А.А.<sup>1</sup>, Земляков А.Е.<sup>3</sup>

## Особенности иммунного микроокружения в плаценте и гравидарном эндометрии у мышей со спонтанными, индуцированными и потенцированными абортами

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ морфологии человека» Минобрнауки России, 117418, г. Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)», 119991, г. Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», 295007, г. Симферополь, Россия

### Резюме

Невынашивание беременности остается актуальной медико-социальной проблемой во всем мире. Фетально-материнское взаимодействие, в котором большое значение играют про- и противовоспалительные цитокины, определяет исход беременности. **Целью** исследования была сравнительная оценка иммунного микроокружения в плаценте и гравидарном эндометрии на различных мышиных моделях беременности. При моделировании физиологической беременности использовали комбинацию мышей ♀СВА×♂BALB/c. Спонтанные абортывоспроизводили при скрещивании ♀СВА×♂DBA/2. Индуцированные или потенцированные иммуностимулятором абортывмоделировали соответственно в комбинациях ♀СВА×♂BALB/c или ♀СВА×♂DBA/2 внутрибрюшинным введением β-гептилгликозида мурамилдипептида на 5-й и 7-й дни гестации. Мышей выводили из эксперимента на 8-й день гестации и выделяли маточно-плацентарные единицы. В фиксированных формалином срезах маточно-плацентарных единиц, залитых парафином, иммуногистохимически окрашивали клетки, продуцирующие трансформирующий ростовой фактор-β (ТФРβ) и интерлейкин-10 (ИЛ-10), с последующей оценкой плотности их распределения. В супернатантах гомогенатов маточно-плацентарных единиц определяли концентрацию цитокинов ИЛ-1α, ИЛ-5, ИЛ-10, интерферона-γ (ИФН-γ). На модели спонтанных абортов плотность ТФРβ- и ИЛ-10-продуцирующих клеток в гравидарном эндометрии была существенно ниже, чем у мышей с физиологической беременностью. В условиях индуцированных абортов количество этих клеток не отличалось от такового при физиологической беременности, а на модели потенцированных абортов была снижена плотность распределения только ИЛ-10<sup>+</sup>-клеток. В гомогенатах маточно-плацентарных единиц мышей отмечался низкий уровень ИЛ-1α в группах спонтанных и потенцированных абортов. В группе индуцированных абортов наблюдали наибольший уровень ИЛ-5 в сравнении с группами физиологической беременности и потенцированных абортов. Уровень ИЛ-10 был наибольшим в группе физиологической беременности, а в группе спонтанных абортов – наименьшим, что соответствовало показателям плотности ИЛ-10<sup>+</sup>-клеток, полученных в результате анализа иммуногистохимического окрашивания. Уровень ИФН-γ был наибольшим в группе физиологической беременности и наименьшим в группе спонтанных абортов. В группе потенцированных абортов его уровень увеличился по сравнению с группой спонтанных абортов. Усиление резорбции в группе индуцированных абортов происходит на фоне снижения уровня ИЛ-10 и повышения уровня ИЛ-5, а в группе потенцированных абортов – на фоне повышения уровней как ИЛ-10, так и ИФН-γ. Очевидно, что абортотенное действие С7МДП у беременных мышей с исходно различным уровнем эмбриональных потерь реализуется с участием различных иммунных механизмов.

**Ключевые слова:** иммунная толерантность; цитокины; мурамилдипептид; невынашивание беременности

Статья поступила 27.09.2019. Принята в печать 16.10.2019.

**Для цитирования:** Артемьева К.А., Богданова И.М., Степанова И.И., Болтовская М.Н., Калюжин О.В., Степанов А.А., Земляков А.Е. Особенности иммунного микроокружения в плаценте и гравидарном эндометрии у мышей со спонтанными, индуцированными и потенцированными абортами. Иммунология. 2019; 40 (6): 26–33. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16004

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Для корреспонденции

Артемьева Ксения Александровна –  
кандидат медицинских наук,  
научный сотрудник  
лаборатории патологии репродукции  
ФГБНУ «НИИ морфологии человека»  
Минобрнауки России, Москва, Россия  
E-mail: artemjeva\_ksenia@mail.ru  
<http://orcid.org/0000-0002-1014-752X>

Artemyeva K.A.<sup>1</sup>, Bogdanova I.M.<sup>1</sup>, Stepanova I.I.<sup>1</sup>, Boltovskaya M.N.<sup>1</sup>,  
Kalyuzhin O.V.<sup>2</sup>, Stepanov A.A.<sup>1</sup>, Zemlyakov A.E.<sup>3</sup>

## Features of the immune microenvironment in the placenta and gravidar endometrium in mice with spontaneous, induced and potentiated abortions

<sup>1</sup>Research Institute of Human Morphology, Ministry of High Education and Science of the Russian Federation, 117418, Moscow, Russia

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russia

<sup>3</sup>V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 295007, Simferopol, Russia

### Abstract

Miscarriage remains an actual public health problem worldwide. Fetal-maternal interaction, in which pro- and anti-inflammatory cytokines are of great importance, determines the outcome of pregnancy. The aim of the study was to perform a comparative assessment of the immune microenvironment in the placenta and gravidar endometrium in various mouse models of pregnancy. The non-abortion-prone ♀CBA×♂Balb/c mating was used for modeling a physiological pregnancy. Spontaneous abortions were reproduced by the abortion-prone ♀CBA×♂DBA/2 mating. Abortions induced or potentiated by an immunostimulant were simulated in ♀CBA×♂BALB/c or CBA×♂DBA/2 matings, respectively, by intraperitoneal injections of muramyl dipeptide  $\beta$ -heptylglycoside (C7MDP) on the 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days of gestation. Mice were sacrificed on the 8<sup>th</sup> day of gestation, then uteroplacental units were isolated. In formalin-fixed, paraffin embedded tissue sections from uteroplacental units, cells producing transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and interleukin-10 (IL-10) were immunohistochemically stained, followed by an assessment of their distribution density. In homogenates of uteroplacental units of mice, a low level of IL-1 $\alpha$  was observed in the groups of spontaneous and potentiated abortions. In the group of induced abortions, the highest level of IL-5 was observed in comparison with the groups of physiological pregnancy and potentiated abortions. The level of IL-10 was the highest in the group of physiological pregnancy, and the lowest in the group of spontaneous abortions, which corresponded to the density of IL-10<sup>+</sup>-cells obtained by analysis of immunohistochemical staining. IFN- $\gamma$  was highest in the physiological pregnancy group and lowest in the spontaneous abortion group. In the group of potentiated abortions, its level increased in comparison with the group of spontaneous abortions. Increased resorption in the induced abortion group occurs against the background of a decrease in IL-10 and an increase in IL-5, and in the potentiated abortion group against a background of an increase in both IL-10 and IFN- $\gamma$ . Obviously, the abortogenic effect of C7MDP in pregnant mice with initially different levels of embryonic loss is realized with the participation of various immune mechanisms.

**Keywords:** immune tolerance; cytokines; muramyl dipeptide; miscarriage

Received 27.09.2019. Accepted 16.10.2019.

**For citation:** Artemyeva K.A., Bogdanova I.M., Stepanova I.I., Boltovskaya M.N., Kalyuzhin O.V., Stepanov A.A., Zemlyakov A.E. Features of the immune microenvironment in the placenta and gravidar endometrium in mice with spontaneous, induced and potentiated abortions. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 26–33. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16004

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

### Введение

Частота невынашивания беременности варьирует от 12 до 27% всех клинически установленных беременностей и не имеет тенденции к снижению [1]. Более чем в 30% случаев потери беременности обусловлены нарушениями иммунной толерантности матери к фетоплацентарной единице [2]. При этом механизмы, с помощью которых иммунные расстройства вызывают самопроизвольный аборт, остаются до конца не изученными. Гестация сопровождается сложными по динамике и последовательности, строго регулируемые им-

мунными реакциями, направленными на поддержание полуаллогенной беременности путем создания толерогенного микроокружения для тканей плода, экспрессирующего чужеродные отцовские антигены. Иммунологическая связь между матерью и развивающимся в ней зародышем в отсутствие прямого контакта формируется благодаря взаимодействию материнского и фетального компонентов плаценты, а именно децидуальной оболочки и трофобласта соответственно. Толерантность иммунной системы матери к фетальным антигенам осуществляется в присутствии большого числа материнских лейкоцитов.

### For correspondence

Artemyeva Ksenia A. –  
PhD, Researcher,  
Reproduction Pathology Laboratory,  
Research Institute  
of Human Morphology,  
Ministry of High Education  
and Science of the Russian Federation,  
Moscow, Russia  
E-mail: artemjeva\_ksenia@mail.ru  
<http://orcid.org/0000-0002-1014-752X>

Иммуномодулирующие молекулы, экспрессируемые и секретлируемые клетками децидуа и плаценты, могут быть прямо вовлечены в супрессию локальных воспалительных реакций. Интерлейкин-10 (ИЛ-10) считается одним из важнейших медиаторов успешной беременности у человека и мыши. Он играет ключевую роль в поддержании иммунной толерантности, главным образом через снижение уровня провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12 и фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), и блокаду экспрессии молекул II класса главного комплекса гистосовместимости и костимуляторных молекул CD80/CD86 [3]. ИЛ-10 продуцируют клетки адаптивного иммунитета, включая регуляторные Т-клетки (Treg) и некоторые субпопуляции CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, а также клетки врожденного иммунитета – моноциты, макрофаги, дендритные клетки, гранулоциты, нейтрофилы, эозинофилы и тучные клетки [4, 5]. Выработка ИЛ-10 контролируется и программируется в маточно-плацентарной зоне (МПЗ) на различных стадиях нормальной беременности. У мышей ИЛ-10 экспрессируется в течение всей гестации с пиком на 12-й день. Нарушения продукции ИЛ-10 ассоциированы с невынашиванием и осложнениями беременности, такими как преждевременные роды, задержка роста плода и преэклампсия. На моделях *in vivo* показано, что введение рекомбинантного ИЛ-10 полностью или частично купирует симптомы, характерные для неблагоприятных исходов беременности [6].

Трансформирующий ростовой фактор  $\beta$  (ТФР $\beta$ ) – еще один ключевой медиатор иммуносупрессии, индуцируемой Treg, которые могут непосредственно секретировать растворимые супрессорные факторы или индуцировать их выработку другими, в том числе антиген-представляющими, клетками [7]. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Treg играют важную роль в поддержании фетальной толерантности в период имплантации и в ранней фазе беременности, но их участие не является необходимым в поздние сроки аллогенной беременности у мышей [8, 9]. ТФР $\beta$  поляризует дифференцировку наивных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Т-клеток после антигенной стимуляции в CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-Treg [10].

Основным постулатом современных представлений о роли иммунной системы во время беременности является активное фетально-материнское взаимодействие, в котором ведущую роль играют про- и противовоспалительные цитокины [11–14]. Так, ИЛ-10 рассматривается как ключевой цитокин ранней беременности, поскольку участвует в ряде важнейших событий, таких как формирование плаценты [15], плацентарный ангиогенез, регуляция трофобластической инвазии, а также защищает фетоплацентарную единицу путем подавления синтеза и секреции провоспалительных цитокинов, включая ИЛ-6, ФНО $\alpha$ , интерферон  $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ). ИЛ-10 также может участвовать в M2-поляризации через активацию сигнального пути JAK-STAT при связывании с ИЛ-10 специфическим рецепторным комплексом [16]. Влияние ИЛ-5 на рост и функции плаценты и массу потом-

ства определяется генотипом самца. Так, у потомства ИЛ-5-нокаутных самок отмечали небольшое увеличение массы тела, более выраженное у F1 C57Bl/6 и CBA [17]. ИЛ-1 $\alpha$  повышает экспрессию металлопротеиназы MMP-3, необходимой для ремоделирования стромы, в периимплантационном периоде, обеспечивая прогрессирование беременности [18]. С другой стороны, повышение уровня ИЛ-1 $\alpha$  может быть одной из причин потери беременности [19]. ИФН- $\gamma$  играет важную физиологическую роль в структурно-функциональной гестационной перестройке стромы и сосудов эндометрия, регуляции активности трофобласта [20]. В то же время ряд клинических и экспериментальных данных свидетельствуют о том, что избыток ИФН- $\gamma$  связан с осложнениями беременности вплоть до гибели плода у человека и животных [21].

Мышь, обладая сходным с человеком типом маточно-плацентарной области и плаценты, а также близкой к человеку структурой материнского и плодного кровообращения [22], широко используется для моделирования невынашивания. Самки мышей CBA/J, спаривающиеся с самцами DBA/2, подвержены спонтанному прерыванию беременности вследствие многочисленных иммунных нарушений и часто используются при моделировании спонтанных абортотворений [23]. Ранее нами были разработаны модели индуцированных и потенцированных абортотворений, вызванных введением  $\beta$ -гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) мышам с исходно физиологической беременностью или спонтанными абортами соответственно [24]. С7МДП является синтетическим производным мурамилдипептида (МДП) – природного иммуноактивного компонента пептидогликана клеточной стенки бактерий [25, 26]. Связываясь с рецептором NOD2, МДП и его производные запускают NF- $\kappa$ B-сигнальный путь [27, 28] и стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов Th1-клетками и макрофагами [29, 30].

На моделях *in vivo* установлено, что МДП усиливает гуморальный и клеточный иммунный ответ, регулирует баланс Th1/Th2 [31, 32, 33]. Особый интерес для иммунологии репродукции представляет присутствие NOD2-рецепторов в цитотрофобласте и синцитиотрофобласте в I триместре беременности человека [34]. Клетки трофобласта *in vitro* отвечают на экспозицию с МДП продукцией провоспалительных цитокинов. Реакция является специфичной, поскольку NOD2-дефицитные линии клеток трофобласта не отвечают на МДП [35].

**Цель работы** – сравнительная оценка иммунного микроокружения в плаценте и гравидарном эндометрии у мышей при спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах.

## Материал и методы

### Экспериментальные животные

Исследование проводили на 8–10-недельных мышах инбредных линий CBA, DBA/2, Balb/c массой тела 23–25 г, полученных из филиала «Столбовая» Научного

центра биомедицинских технологий ФМБА России. Эксперименты осуществляли в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека (протокол № 6А от 19 октября 2009 г.)

### Моделирование физиологической и патологической беременности у мышей

С целью получения датированной беременности самок в стадии проэструс-эструс подсаживали на ночь к самцам в отношении 3–4:1. День появления копулятивной пробки обозначали как 1-й день гестации (ДГ).

Для моделирования аллогенной физиологической беременности использовали комбинацию линий мышей ♀СВА×♂ Balb/c, высокий уровень спонтанных абортос воспроизводили при скрещивании самок СВА с самцами DBA/2 [36]. Для моделирования индуцированных и потенцированных абортос группам мышей с исходно нормальной беременностью или спонтанными абортос соответственно на 5-й ДГ (завершение имплантации) и 7-й ДГ (до начала формирования плаценты) внутрибрюшинно в 0,1 мл 0,9% раствора NaCl вводили С7МДП в дозе 20 мкг на 1 животное ( $\approx 1$  мг/кг). С7МДП синтезирован по методу [37] и предоставлен для моделирования иммунозависимых абортос кафедрой органической химии ФГАОУ ВО Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. Выбранная доза С7МДП соответствовала ED<sub>50</sub> определенной в серии экспериментов на моделях сепсиса *in vivo* [29]. Мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом на 8-й ДГ (начало формирования плаценты). Частоту резорбции оценивали по формуле

$$R = \frac{Re}{Re + F} \times 100\%,$$

где  $R$  – доля резорбированных эмбрионов/плодов по отношению к общему числу плодов,  $Re$  – количество резорбированных эмбрионов,  $F$  – количество жизнеспособных эмбрионов [38].

Для проведения исследования были сформированы 4 экспериментальные группы животных по 6 особей в каждой:

- 1) самки с физиологической беременностью;
- 2) самки со спонтанными абортос;
- 3) самки с индуцированными абортос;
- 4) самки с потенцированными абортос.

### Имуногистохимическое окрашивание

После выведения животных из эксперимента осуществляли забор маточно-плацентарных единиц. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Кусочки тканей проводили по спиртам восходящей крепости (70°, 80°, 96°, 100°), заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм. В фиксированных

формалином срезах препаратов маточно-плацентарных единиц, залитых парафином, были специфически окрашены клетки, продуцирующие ТФР-β и ИЛ-10, кроличьими поликлональными анти-ТФРβ (1:100, ab 66043, Abcam, Cambridge, Великобритания) козьими поликлональными анти-ИЛ-10 (sc-1783, 1: 100, Santa Cruz Biotechnology, Texas, США) соответственно. В качестве вторичных антител были использованы кроличьи поликлональные антитела к IgG козы, меченные пероксидазой хрена (ab 6741, Abcam, Cambridge, UK), а также набор для проявления LabVision™ Ultra Vision™ LP Detection System: HRP Polymer/DAB Plus Chromogen (TL-015-HD), ThermoScientific™, Cheshire, Великобритания). По окончании инкубации с антителами срезы докрашивали гематоксилином Майера.

### Выделение маточно-плацентарных тканей для определения продукции цитокинов *ex vivo*

Маточно-плацентарные единицы каждой мыши измельчали ножницами и в гомогенизаторе Поттера в растворе Хенкса, pH 7,2 (ПанЭко, Россия), с добавлением 1 таблетки смеси ингибиторов протеаз / 10 мл Complete Mini protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indianapolis, США): 50 мг ткани в 0,5 мл раствора. После этого их центрифугировали при 12000 об/мин в течение 3 минут. Супернатанты собирали в объеме 0,3 мл и измеряли концентрацию белка по Лоури. Затем их хранили при -80°C до использования для анализа.

### Проточная цитофлуориметрия

Концентрацию цитокинов ИЛ-1α, -5, -10, ИФН-γ определяли в супернатантах гомогенатов маточно-плацентарных единиц, выделенных на 8-й ДГ с использованием набора Mouse TX1/TX2 10plex (Bender Med Systems, Австрия) на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США). Концентрацию цитокинов вычисляли с помощью программы Flow Cytomix Pro (Beckman Coulter, США).

### Морфометрические методы

Морфометрическое исследование проводили на микроскопе Leica DM 2500 с цифровой фотокамерой при помощи графического планшета и программы Image Scope M (Leica Microsystems GmbH, Германия). Подсчитывали плотность распределения ТФРβ- и ИЛ-10<sup>+</sup>-клеток на 1 мм<sup>2</sup> площади гравидарного эндометрия в препаратах маточно-плацентарных единиц.

### Статистическая обработка результатов

Данные анализировали с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc.). Характер распределения анализируемых параметров в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова, для сравнения двух выборок использовали непараметрический  $U$ -критерий Манна–Уитни. Для сравнения долей применяли  $z$ -критерий с коррекцией Йейтса. Результаты представляли в виде медианы и квартилей. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

**Таблица 1.** Частота резорбции эмбрионов на 8-й день гестации

Группа	Общее число эмбрионов	Число резорбированных эмбрионов	Частота резорбции, %
Физиологическая беременность ( $n = 6$ )	48	6	12,5
Спонтанные аборт ( $n = 6$ )	46	16	34,8*
Индукцированные аборт ( $n = 6$ )	45	21	46,7*
Потенцированные аборт ( $n = 6$ )	48	24	50,0*

**Примечание.** Статистически значимые отличия,  $p < 0,05$ ; \* – от физиологической беременности.

## Результаты

В настоящей работе на 8-й ДГ частота резорбции в группе физиологической беременности составляла 12,5%, спонтанных абортов – 34,8%, группах индуцированных и потенцированных абортов – 46,7 и 50,0% соответственно (табл. 1). Развивающуюся беременность характеризовало наличие полноценного эмбриона и всех его мембран. Эктоплацентарный конус (ЭПК) имел характерную заостренную форму. Четко визуализировались гигантские клетки трофобласта, расположенные по периметру эмбриональной полости. Резорбцией считали как полное исчезновение эмбриона и его мембран, так и отдельные изменения: задержку роста, значительные нарушения строения ЭПК, в т. ч. уплощение или полное его исчезновение. Наблюдали расширение сосудов в зоне мезометриальной *decidua* (вплоть до формирования гигантских полостей) и застой крови в них, а также конденсацию трофобласта и геморрагии в *decidua basalis*.

В результате проведенного исследования выявили следующие изменения в маточно-плацентарной области (табл. 2). Медиана плотности клеток, продуцирующих

**Таблица 2.** Плотность распределения ТФРβ<sup>+</sup>- и ИЛ-10<sup>+</sup>-клеток в маточно-плацентарной области (клеток/мм<sup>2</sup>), *Me* (Q1;Q3)

Группы	ТФРβ	ИЛ-10
Физиологическая беременность (1)	<b>10,89</b> (6,23;17,01)	<b>12,17</b> (7,55;16,17)
Спонтанные аборт (2)	<b>1,9</b> (1,16; 3,47)	<b>0</b> (0,0; 4,1)
Индукцированные аборт (3)	<b>12,75</b> (5,55; 21,44)	<b>9,67</b> (6,12; 14,37)
Потенцированные аборт (4)	<b>8,85</b> (3,56;14,17)	<b>4,55</b> (3,39; 8,05)
Достоверность различий	$p_{1-2} = 0,001$ $p_{1-3} = 0,943$ $p_{1-4} = 0,21$ $p_{2-4} = 0,021$ $p_{3-4} = 0,128$	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} = 0,5$ $p_{1-4} = 0,005$ $p_{2-4} = 0,006$ $p_{3-4} = 0,005$

ТФРβ, была наибольшей в группе индуцированных абортов и наименьшей – в группе спонтанных абортов. Медиана плотности клеток, продуцирующих ИЛ-10, в группе физиологической беременности была наибольшей, а в группе спонтанных абортов – наименьшей.

В сравнении с группой физиологической беременности группа спонтанных абортов изначально отличалась низким уровнем ТФРβ- и ИЛ-10-продуцирующих клеток. Вероятно, это является одной из причин высокого уровня резорбции эмбрионов в этой группе. Группу потенцированных абортов отличала большая плотность ТФРβ<sup>+</sup>- и ИЛ-10<sup>+</sup>- клеток по сравнению с группой спонтанных абортов, но меньшая – по сравнению с группой индуцированных абортов.

Измеряли концентрацию цитокинов ИЛ-1α, ИЛ-5, ИЛ-10, и ИФН-γ в гомогенатах маточно-плацентарных единиц (табл. 3). В сравнении с группой физиологической беременности отмечалось снижение уровня ИЛ-1α в группах спонтанных и потенцированных абортов, а в группе потенцированных абортов – по сравнению с группой индуцированных. В группе индуцированных абортов наблюдали наибольший уровень ИЛ-5 в сравнении с группами физиологической беременности и потенцированных абортов. Уровень ИЛ-10 был наибольшим в группе физиологической беременности, достоверно отличаясь от уровня этого цитокина в группах спонтанных и индуцированных абортов, а в группе спонтанных абортов – наименьшим, что соответствовало показателям плотности ИЛ-10<sup>+</sup>-клеток, полученных в результате анализа иммуногистохимического окрашивания. Отмечалось снижение уровня ИЛ-10 в группе индуцированных абортов по сравнению с группой физиологической беременности, но повышение его в группе потенцированных абортов в сравнении с группой спонтанных абортов. Уровень ИФН-γ был наибольшим в группе физиологической беременности и наименьшим в группе спонтанных абортов. В группе потенцированных абортов его уровень увеличился по сравнению с группой спонтанных абортов.

## Обсуждение

Полученные результаты определения частоты резорбции на 8-й ДГ были сопоставимы как с результатами других авторов (7–13% и 11–41% резорбированных эмбрионов при моделировании физиологической беременности и спонтанных абортов, соответственно) [39], так и с нашими результатами определения резорбции на 14-й ДГ [40]. Очевидно, в течение 24–72 ч после первого введения С7МДП происходили структурно-функциональные изменения плаценты и гибель эмбриона. В сравнении с группой физиологической беременности, группа спонтанных абортов изначально отличалась низким уровнем ТФРβ- и ИЛ-10-продуцирующих клеток. Вероятно, это является одной из причин высокого уровня резорбции эмбрионов в этой группе. Потенцированные аборт отличала большая плотность ТФРβ<sup>+</sup>- и ИЛ-10<sup>+</sup>- клеток по сравнению

Таблица 3. Уровень цитокинов в маточно-плацентарных единицах (пг/мг белка), *Me* (Q1; Q3)

Группа	Цитокины	ИЛ-1α	ИЛ-5	ИЛ-10	ИФН-γ
Физиологическая беременность (1)		4,87 (4,57;7,23)	6,19 (3,51;10,54)	11,17 (8,57;13,3)	25,69 (13,73;28,96)
Спонтанные аборты (2)		2,34 (2,31;2,39)	5,24 (4,82;7,76)	2,88 (1,85;3,61)	9,12 (7,28;9,89)
Индукцированные аборты (3)		5,89 (4,79;6,95)	13,23 (11,85;18,64)	7,91 (7,17;9,36)	23,36 (11,99; 29,23)
Потенцированные аборты (4)		2,14 (1,78;2,44)	5,52 (3,79;7,43)	4,18 (2,49;4,48)	12,11 (12,01;12,58)
Достоверность различий		$p_{1-2} = 0,005$ $p_{1-3} = 0,432$ $p_{1-4} = 0,005$ $p_{2-4} = 0,842$ $p_{3-4} < 0,001$	$p_{1-2} = 0,432$ $p_{1-3} = 0,025$ $p_{1-4} = 0,394$ $p_{2-4} = 1,000$ $p_{3-4} = 0,005$	$p_{1-2} = 0,001$ $p_{1-3} = 0,025$ $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} = 0,038$ $p_{3-4} = 0,01$	$p_{1-2} = 0,001$ $p_{1-3} = 1,000$ $p_{1-4} = 0,038$ $p_{2-4} = 0,005$ $p_{3-4} = 0,038$

со спонтанными, но меньшая – по сравнению с индуцированными абортными. Очевидно, это связано со способностью С7МДП усиливать гуморальный и клеточный иммунный ответ, а также регулировать баланс Th1/Th2. Линейными различиями объясняется, вероятно, тот факт, что в группе индуцированных абортов не наблюдалось статистически значимых изменений в плотности распределения ТФРβ- и ИЛ-10-продуцирующих клеток в сравнении с физиологической беременностью. Увеличение количества этих клеток, в свою очередь, не отменяло абортотропный эффект других факторов, определяющих высокий уровень резорбции в группе потенцированных абортов, и не запускало компенсаторный механизм, направленный на отмену резорбции. Примечательно, что минимальные значения уровней цитокинов характерны для группы спонтанных абортов. Исследование культивируемых клеток трофобласта мыши, полученных из ЭПК, показало, что ИФН-γ усиливает фагоцитарную активность клеток трофобласта как механизм снабжения плода железом и питательными веществами до начала формирования и функционирования плаценты [41]. Таким образом, как избыток, так и недостаток этого цитокина может оказывать неблагоприятное воздействие на развивающийся эмбрион. Де-

фицит плацентарной и децидуальной продукции ИЛ-10 ассоциирован с внутриутробной задержкой роста плода у женщин и лабораторных мышей, а также характерен для беременности с высокой частотой спонтанных абортов [42, 43]. Несмотря на однотипное воздействие С7МДП на беременных самок, усиление резорбции в группе индуцированных абортов происходит на фоне снижения уровня ИЛ-10 и повышения уровня ИЛ-5, а в группе потенцированных абортов – на фоне повышения уровней как ИЛ-10, так и ИФН-γ. Подобное различие можно объяснить как индивидуально-групповыми различиями в реактивности животных, так и плеiotропным эффектом данного вещества. Очевидно, абортотропное действие С7МДП у беременных мышей с исходно различным уровнем эмбриональных потерь реализуется с участием различных иммунных механизмов. Таким образом, в работе впервые исследованы особенности экспрессии цитокинов ТФРβ, ИЛ-1α, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИФН-γ, участвующих, по данным литературных источников, в создании толерогенного микроокружения маточно-плацентарной единицы и защищающих эмбрион от иммунной атаки со стороны матери, на моделях индуцированного и потенцированного невынашивания беременности у мышей.

## ■ Литература

1. Внутриутробное развитие человека. Руководство для врачей. Под редакцией проф. А.П. Милованова, проф. С.В. Савельева. М.: МДВ. 2006.
2. Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. Невынашивание беременности: Руководство для практикующих врачей М.: МИА. 2011.
3. Robertson S.A., Care A.S., Skinner R.J. Interleukin 10 regulates inflammatory cytokine synthesis to protect against lipopolysaccharide-induced abortion and fetal growth restriction in mice. *Biol. Reprod.* 2007; 76 (5): 738–748. doi: 10.1095/biolreprod.106.056143
4. Saraiva M., O’Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells // *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (3): 170–181. doi: 10.1038/nri2711
5. Cheng S.B., Sharma S. Interleukin-10: a pleiotropic regulator in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2015; 73 (6): 487–500. doi: 10.1111/aji.12329
6. Lai Z., Kalkunte S., Sharma S. A critical role of interleukin-10 in modulating hypoxia-induced preeclampsia-like disease in mice. *Hypertension.* 2011; 57 (3): 505–514. doi: 10.1161/Hypertension.110.163329
7. Sojka D.K., Huang Y.H., Fowell D.J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology.* 2008; 124 (1): 13–22. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02813.x
8. Aluvihare V.R., Kallikourdis M., Betz A.G. Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J. Mol. Med. (Berl).* 2005; 83 (2): 88–96. doi: 10.1007/s00109-004-0608-2
9. Shima T., Sasaki Y., Itoh M., Nakashima A., Ishii N., Sugamura K. 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): 121–129. doi: 10.1016/j.jui.2010.02.006
10. Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinon N. et al. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naïve T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 2003; 198 (12): 1875–1886. doi: 10.1084/jem.20030152
11. Kwak-Kim J., Park J.C., Ahn H.K., Kim J.W., Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 611–623. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00847.x
12. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 601–610. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x
13. Mor G., Cardenas I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 425–433. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x
14. Chen S.J., Liu Y.L., Sytwu H.K. Immunologic Regulation in Pregnancy: From Mechanism to Therapeutic Strategy for Immu-

nomodulation. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 258–391. doi: 10.1155/2012/258391

15. Thaxton J.E., Sharma S. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 482–491. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00810x

16. Porta C., Riboldi E., Ippolito A., Sica A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin. Immunol.* 2015; 27 (4): 237–248. doi: 10.1016/j.semin.2015.10.003

17. Ingman W.V., Jones R.L. Cytokine knockouts in reproduction: the use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproductive biology. *Hum. Reprod. Update.* 2008; 14 (2): 179–192. doi:10.1093/humupd/dmm042

18. Nishiura R., Noda N., Minoura H., Toyoda N., Imanaka-Yoshida K., Sakakura T., Yoshida T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in mouse endometrial stromal cells during early pregnancy: regulation by interleukin-1alpha and tenascin-C. *Gynecol. Endocrinol.* 2005; 21 (2): 111–118. doi: 10.1080/09513590500168399

19. Deb K., Chaturvedi M.M., Jaiswal Y.K. A 'minimum dose' of lipopolysaccharide required for implantation failure: assessment of its effect on the maternal reproductive organs and interleukin-1alpha expression in the mouse. *Reproduction.* 2004; 128 (1): 87–97. doi: 10.1530/rep.1.00110

20. Kitaya K., Yasuo T., Yamaguchi T., Fushiki S., Honjo H. Genes regulated by interferon-gamma in human uterine microvascular endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 2007; 20 (5): 689–697.

21. Murphy S.P., Tayade C., Ashkar A.A., Hatta K., Zhang J., Croy B.A. Interferon Gamma in Successful Pregnancies. *Biol. Reprod.* 2009; 80 (5): 848–859. doi: 10.1095/biolreprod.108.073353

22. Carter A.M. Animal models of human placentation. *Placenta.* 2007; 21 (A): 41–47.

23. Kwak-Kim J., Bao S., Lee S.K., Kim J.W., Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2014; 72 (2): 129–140. doi: 10.1111/aji.12234

24. Артемьева К.А., Болтовская М.Н., Калюжин О.В. Моделирование индуцированного невынашивания беременности на мышцах с использованием гликозида мурамилдипептида. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».* 2012; 2: 34–39.

25. Hedl M., Abraham C. Distinct roles for Nod2 protein and autocrine interleukin-1beta in muramyl dipeptide-induced mitogen-activated protein kinase activation and cytokine secretion in human macrophages. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (30): 26440–26449. doi: 10.1074/jbc.M111.237495

26. Kusumoto S., Fukase K., Shiba T. Key structures of bacterial peptidoglycan and lipopolysaccharide triggering the innate immune system of higher animals: Chemical synthesis and functional studies. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2010; 86 (4): 322–337.

27. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., Pons F., Crespo J. et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (8): 5509–5512. doi: 10.1074/jbc.C200673200

28. Athié-Morales V., O'Connor G.M., Gardiner C.M. Activation of Human NK Cells by the Bacterial Pathogen-Associated Molecular Pattern Muramyl Dipeptide. *The Journal of Immunology.* 2008; 180 (6): 4082–4089. doi: 10.4049/jimmunol.180.6.4082

29. Калюжин О.В., Калина Н.Г., Баштаненко А.Ф., Шкалев М.В., Кузовлев Ф.Н., Калюжин В.В. Стимуляция резистентности мышечной к бактериальной инфекции гликозидами мурамилдипептида. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 2003; 135 (5): 531–535.

30. Калюжин О.В., Земляков А.Е., Калина Н.Г., Мулик Е.Л., Кузовлев Ф.Н., Макарова О.В. Биологическая активность аномальных пар липофильных гликозидов N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 2008; 145 (5): 561–564.

31. Hirota S.A., Ng J., Lueng A., Khajah M., Parhar K., Li Y. et al. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2011; 17 (6): 1359–1372. doi: 10.1002/ibd.21478

32. Matsui K., Ikeda R. Peptidoglycan in combination with muramyl dipeptide synergistically induces an interleukin-10-dependent T helper 2-dominant immune response. *Microbiol Immunol.* 2014; 58 (4): 260–265. doi: 10.1111/1348-0421.12139

33. Kotani S., Tsujimoto M., Koga T., Nagao S., Tanaka A., Kawata S. Chemical structure and biological activity relationship of bacterial cell walls and muramyl peptides. *Federat. Proc.* 1986; 45 (11): 2534–2540.

34. Abrahams V.M. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. *J. Reprod. Immunol.* 2011; 88 (2): 112–117. doi: 10.1016/j.jri.2010.12.003

35. Costello M.J., Joyce S.K., Abrahams V.M. NOD protein expression and function in first trimester trophoblast cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 57 (1): 67–80. doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00447.x

36. Clark D.A., Chaouat G., Banwatt D., Friebe A., Arck P.C. Ecology of danger-dependent cytokine-boosted spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model: II. Fecal LPS levels in colonies with different basal abortion rates. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008; 60 (6): 529–933. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00652.x

37. Земляков А.Е., Цикалов В.В., Калюжин О.В. Синтез и исследование влияния конфигурации гликозидной связи и природы агликона на иммуностимулирующую активность гликозидов мурамилдипептида. *Физиологически активные вещества.* 2002; (1): 35–38.

38. Du M.R., Dong L., Zhou W.H., Yan F.T., Li D.J. Cyclosporin A improves pregnancy outcome by promoting functions of trophoblasts and inducing maternal tolerance to the allogeneic fetus in abortion-prone matings in the mouse. *Biol. Reprod.* 2007; 76 (5): 906–914. doi: 10.1095/biolreprod.106.056648

39. Chaouat G., Menu E., Clark D.A., Dy M., Minkowski M., Wegmann T.G. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 89 (2): 447–458.

40. Артемьева К.А., Болтовская М.Н., Калюжин О.В. Моделирование индуцированного невынашивания беременности на мышцах с использованием гликозида мурамилдипептида. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».* 2012; (2): 34–39.

41. Albieri A., Hoshida M.S., Gagioti S.M., Leanza E.C., Abrahamsohn I., Croy A. et al. Interferon-gamma alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005; (3): 34. doi: 10.1186/1477-7827-3-34

42. Moreli J.B., Ruocco A.M.C., Vernini J.M., Rudge M.V.C., Calderon I.M.P. Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Pregnancy: Aspects of Interest in Clinical Obstetrics ISRN. *Obstet. Gynecol.* 2012; 2012: 230742. doi: 10.5402/2012/230742

43. Zenclussen M.L., Thuere C., Ahmad N., Wafula P.O., Fest S., Teles A. 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): 200–208. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00793.x

## ■ References

1. Intrauterine development of a person. A guide for doctors. Edited by prof. A.P. Milovanov, prof. S.V. Saveliev. M.: MDV. 2006. (in Russian)

2. Sidelnikova V.M., Sukhikh G.T. Miscarriage: A Guide for Practitioners M.: MIA. 2011. (in Russian)

3. Robertson S.A., Care A.S., Skinner R.J. Interleukin 10 regulates inflammatory cytokine synthesis to protect against lipopolysaccharide-induced abortion and fetal growth restriction in mice. *Biol. Reprod.* 2007; 76 (5): 738–48. doi: 10.1095/biolreprod.106.056143

4. Saraiva M., O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (3): 170–81. doi: 10.1038/nri2711

5. Cheng S.B., Sharma S. Interleukin-10: a pleiotropic regulator in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2015; 73 (6): 487–500. doi: 10.1111/aji.12329

6. Lai Z., Kalkunte S., Sharma S. A critical role of interleukin-10 in modulating hypoxia-induced preeclampsia-like disease in mice. *Hypertension.* 2011; 57 (3): 505–14. doi: 10.1161/Hypertension.110.163329

7. Sojka D.K., Huang Y.H., Fowell D.J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology.* 2008; 124 (1): 13–22. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02813.x

8. Aluvihare V.R., Kallikourdis M., Betz A.G. Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J. Mol. Med. (Berl).* 2005; 83 (2): 88–96. doi: 10.1007/s00109-004-0608-2

9. Shima T., Sasaki Y., Itoh M., Nakashima A., Ishii N., Sugamura K., 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

10. Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinon N., et al. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naïve T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 2003; 198 (12): 1875–86. doi: 10.1084/jem.20030152
11. Kwak-Kim J., Park J.C., Ahn H.K., Kim J.W., Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 611–23. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00847.x
12. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 601–10. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x
13. Mor G., Cardenas I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 425–433. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x
14. Chen S.J., Liu Y.L., Sytwu H.K. Immunologic Regulation in Pregnancy: From Mechanism to Therapeutic Strategy for Immunomodulation. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 258391. doi: 10.1155/2012/258391
15. Thaxton J.E., Sharma S. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 482–91. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00810.x
16. Porta C., Riboldi E., Ippolito A., Sica A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin. Immunol.* 2015; 27 (4): 237–48. doi: 10.1016/j.semin.2015.10.003
17. Ingman W.V., Jones R.L. Cytokine knockouts in reproduction: the use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproductive biology. *Hum. Reprod. Update.* 2008; 14 (2): 179–92. doi:10.1093/humupd/dmm042
18. Nishiura R., Noda N., Minoura H., Toyoda N., Imanaka-Yoshida K., Sakakura T., Yoshida T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in mouse endometrial stromal cells during early pregnancy: regulation by interleukin-1 alpha and tenascin-C. *Gynecol. Endocrinol.* 2005; 21 (2): 111–8. doi: 10.1080/09513590500168399
19. Deb K., Chaturvedi M.M., Jaiswal Y.K. A 'minimum dose' of lipopolysaccharide required for implantation failure: assessment of its effect on the maternal reproductive organs and interleukin-1alpha expression in the mouse. *Reproduction.* 2004; 128 (1): 87–97. doi: 10.1530/rep.1.00110
20. Kitaya K., Yasuo T., Yamaguchi T., Fushiki S., Honjo H. Genes regulated by interferon-gamma in human uterine microvascular endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 2007; 20 (5): 689–97.
21. Murphy S.P., Tayade C., Ashkar A.A., Hatta K., Zhang J., Croy B.A. Interferon Gamma in Successful Pregnancies. *Biol. Reprod.* 2009; 80 (5): 848–59. doi: 10.1095/biolreprod.108.073353
22. Carter A. M. Animal models of human placentation. *Placenta.* 2007; 21 (A): 41–47.
23. Kwak-Kim J., Bao S., Lee S.K., Kim J.W., Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2014; 72 (2): 129–40. doi: 10.1111/aji.12234
24. Artemyeva K.A., Boltovskaya M.N., Kalyuzhin O.V. Modeling induced miscarriage in mice using muramyl dipeptide glycoside. *Kursk scientific and practical bulletin «Man and his health.»* 2012; 2: 34–39. (In Russian)
25. Hedl M., Abraham C. Distinct roles for Nod2 protein and autocrine interleukin-1beta in muramyl dipeptide-induced mitogen-activated protein kinase activation and cytokine secretion in human macrophages. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (30): 26440–9. doi: 10.1074/jbc.M111.237495
26. Kusumoto S., Fukase K., Shiba T. Key structures of bacterial peptidoglycan and lipopolysaccharide triggering the innate immune system of higher animals: Chemical synthesis and functional studies. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2010; 86 (4): 322–337.
27. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., Pons F., Crespo J. et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (8): 5509–12. doi: 10.1074/jbc.C200673200
28. Athié-Morales V., O'Connor G.M., Gardiner C.M. Activation of Human NK Cells by the Bacterial Pathogen-Associated Molecular Pattern Muramyl Dipeptide. *The Journal of Immunology.* 2008; 180 (6): 4082–89. doi: 10.4049/jimmunol.180.6.4082
29. Kalyuzhin O.V., Kalina N.G., Bashtanenko A.F., Shkalev M.V., Kuzovlev F.N., Kalyuzhin V.V. Stimulation of mouse resistance to bacterial infection with muramyl dipeptide glycosides. *Bull. Exp. Biol. Honey.* 2003; 135 (5): 531–5. (in Russian)
30. Kalyuzhin O.V., Zemlyakov A.E., Kalina N.G., Mulik E.L., Kuzovlev F.N., Makarova O.V. Biological activity of anomeric pairs of lipophilic glycosides of N-acetylmuramyl-L-alanine-Disoglutamine. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008; 145 (5): 561–4. (in Russian)
31. Hirota S.A., Ng J., Lueng A., Khajah M., Parhar K., Li Y., et al. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2011; 17 (6): 1359–72. doi: 10.1002/ibd.21478
32. Matsui K., Ikeda R. Peptidoglycan in combination with muramyl dipeptide synergistically induces an interleukin-10-dependent T helper 2-dominant immune response. *Microbiol. Immunol.* 2014; 58 (4): 260–5. doi: 10.1111/1348-0421.12139
33. Hirota S., Tsujimoto M., Koga T., Nagao S., Tanaka A., Kawata S. Chemical structure and biological activity relationship of bacterial cell walls and muramyl peptides. *Fed. Proc.* 1986; 45 (11): 2534–40.
34. Abrahams V.M. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. *J. Reprod. Immunol.* 2011; 88 (2): 112–7. doi: 10.1016/j.jri.2010.12.003
35. Costello M.J., Joyce S.K., Abrahams V.M. NOD protein expression and function in first trimester trophoblast cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 57(1):67–80. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2006.00447.x
36. Clark D.A., Chaouat G., Banwatt D., Friebe A., Arck P.C. Ecology of danger-dependent cytokine-boosted spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model: II. Fecal LPS levels in colonies with different basal abortion rates. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008; 60 (6): 529–933. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00652.x
37. Zemlyakov A.E., Tsikalov V.V., Kalyuzhin O.V. Synthesis and study of the effect of the configuration of the glycosidic bond and the nature of aglycon on the immunostimulating activity of muramoyl dipeptide glycosides. *Physiologically active substances.* 2002; 1: 35–38. (in Russian)
38. Du M.R., Dong L., Zhou W.H., Yan F.T., Li D.J. Cyclosporin A improves pregnancy outcome by promoting functions of trophoblasts and inducing maternal tolerance to the allogeneic fetus in abortion-prone matings in the mouse. *Biol. Reprod.* 2007; 76 (5): 906–14. doi: 10.1095/biolreprod.106.056648
39. Chaouat G., Menu E., Clark D.A., Dy M., Minkowski M., Wegmann T.G. Control of fetal survival in CBA x DBA / 2 mice by lymphokine therapy. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 89 (2): 447–58.
40. Artemyeva K.A., Boltovskaya M.N., Kalyuzhin O.V. Modeling of induced miscarriage in mice using the muramyl dipeptide glycoside. *Kursk Scientific and Practical Bull. Man and his Health.* 2012; 2: 34–9. (in Russian)
41. Albieri A., Hoshida M.S., Gagiotti S.M., Leanza E.C., Abrahamsohn I., Croy A. et al. Interferon-gamma alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005; 3: 34. doi: 10.1186/1477-7827-3-34
42. Moreli J.B., Ruocco A.M.C., Vernini J.M., Rudge M.V.C., Calderon I.M.P. Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Pregnancy: Aspects of Interest in Clinical Obstetrics ISRN. *Obstet. Gynecol.* 2012; 2012: 230742 doi: 10.5402/2012/230742
43. Zenclussen M.L., Thuere C., Ahmad N., Wafula P.O., Fest S., Teles A., 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

© Коллектив авторов, 2019

Гурьянова С.В.<sup>1</sup>, Борисова О.Ю.<sup>2,3</sup>, Колесникова Н.В.<sup>4</sup>, Лежава Н.Л.<sup>1</sup>,  
Козлов И.Г.<sup>5</sup>, Гудима Г.О.<sup>6</sup>

## Влияние мурамилпептида на микробный состав микрофлоры ротовой полости

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Медицинский институт, 117198, г. Москва, Россия<sup>2</sup> ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 350063, г. Краснодар, Россия<sup>5</sup> ФГБУ «Национальный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 117198, г. Москва, Россия<sup>6</sup> ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, 115522, г. Москва, Россия

### Резюме

**Введение.** Состав микробиоты полости рта имеет определяющее значение в формировании нормального микробиоценоза, а его дисбаланс может быть причиной патофизиологических процессов не только полости рта, но и всего организма. Нарушение разнообразия микрофлоры ротовой полости, уменьшение в количественном отношении представленности условно-патогенной микрофлоры способствуют заселению патогенными штаммами и коррелируют с различными заболеваниями ротовой полости, такими, как кариес и пародонтиты, заболеваниями желудочно-кишечного тракта и бронхолегочной системы.

**Цель** исследования – определить влияние мурамилпептида ГМДП (Ликопид® 1 мг) на микробный пейзаж ротовой полости здоровых добровольцев.

**Материал и методы.** При информированном согласии у 48 здоровых добровольцев 18–23 лет проводили забор ротовой жидкости до приема ГМДП (профилактический прием, Ликопид® 1 мг) и через 4 дня после 10-дневного курса 1 таблетка сублингвально 1 раз в день. Микробиологическое исследование ротовой жидкости выполняли с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров.

**Результаты.** Иммуномодулирующее средство на основе мурамилпептида способствует увеличению разнообразия микрофлоры ротовой полости, уменьшению в количественном выражении *Candida albicans*, *Clostridium difficile* и *Porphyromonas gingivalis*.

**Заключение.** Применение иммуномодулирующего средства на основе мурамилпептида целесообразно для формирования нормального сбалансированного микробиоценоза с целью предотвращения заселения патогенами.

**Ключевые слова:** микробиота; ротовая полость; мурамилпептид; ГМДП; биоценоз; иммуномодуляторы; мукозальный иммунитет

Статья поступила 10.09.2019. Принята в печать 16.10.2019.

**Для цитирования:** Гурьянова С.В., Борисова О.Ю., Колесникова Н.В., Лежава Н.Л., Козлов И.Г., Гудима Г.О. Влияние мурамилпептида на микробный состав микрофлоры ротовой полости. Иммунология. 2019, 40 (6): 34–40. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16005

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Guryanova S.V.<sup>1</sup>, Borisova O.Yu.<sup>2,3</sup>, Kolesnikova N.V.<sup>4</sup>, Lezhava N.L.<sup>1</sup>,  
Kozlov I.G.<sup>5</sup>, Gudima G.O.<sup>6</sup>

## The effect of muramyl peptide on the microbial landscape of the oral cavity

<sup>1</sup> Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Medical Institute, 117198, Moscow, Russia<sup>2</sup> G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia

### Для корреспонденции

Гурьянова Светлана Владимировна –  
кандидат биологических наук, доцент  
кафедры биологии и общей генетики  
Медицинского института  
ФГАОУ ВО «Российский университет  
дружбы народов»,  
Москва, Россия  
E-mail: svgur@mail.ru<http://orcid.org/0000-0001-6186-2462>

<sup>3</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 350063, Krasnodar, Russia

<sup>5</sup> Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 117198, Moscow, Russia

<sup>6</sup> National Research Center – Institute of immunology of Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russia

## Abstract

**Introduction.** The composition of the microbiota of the oral cavity is crucial in the formation of a normal biocenosis, its imbalance can be the cause of pathophysiological processes not only of the oral cavity, but also of the whole organism. Disorder of the microbiome diversity in the oral cavity, a quantitative decrease in the presence of opportunistic microflora contributes to the population of pathogenic strains and correlates with various diseases of the oral cavity, such as caries and periodontitis, diseases of the gastrointestinal tract and bronchopulmonary system.

**The aim** of the study was to determine the effect of muramyl peptide GMDP (Likopid 1 mg) on the microbial landscape of the oral cavity of healthy volunteers.

**Material and methods.** With informed consent, 48 healthy volunteers aged 18–23 years were taken oral fluid before taking the GMDP (prophylactics with Likopid® 1 mg) and 4 days after a 10–day course, 1 tablet sublingually 1 time per day. A microbiological study of the oral fluid was carried out using gas chromatography-mass spectrometry of microbial markers.

**Results.** The use of an immunomodulating agent based on muramyl peptide increases the diversity of the microflora of the oral cavity, and reduces in quantitative terms *Candida albicans*, *Clostridium difficile* and *Porphyromonas gingivalis*.

**Conclusion.** The use of an immunomodulating agent based on muramyl peptide is advisable for the formation of a normal balanced microbiocenosis in order to prevent pathogen colonization.

**Keywords:** microbiota; oral cavity; muramyl peptide; GMDP; immunomodulators, mucosal immunity

Received 10.09.2019. Accepted 16.10.2019.

**For citation:** Guryanova S.V., Borisova O.Yu., Kolesnikova N.V., Lezhava N.L., Kozlov I.G., Gudima G.O. Effect of muramyl peptide on the microbial landscape of the oral cavity. *Immunologiya*. 2019, 40 (6): 34–40. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16005

**Funding.** The study has not sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

## For correspondence

Guryanova Svetlana V. – PhD,  
Associate Professor  
of Department of Biology  
and General Genetics,

Peoples' Friendship University of Russia  
(RUDN University), Medical Institute,  
Moscow, Russia

E-mail: svgur@mail.ru

<http://orcid.org/0000-0001-6186-2462>

## Введение

Микроорганизмы, населяющие кожные покровы и слизистые человека, являются необходимым условием поддержания гомеостаза, и принимают участие во всех процессах жизнедеятельности организма человека с момента рождения [1–4]. В стерильных условиях в экспериментальной модели животные не способны сформировать адекватную систему защиты от патогенов [5], нарушаются процессы метаболизма, приводящие к ожирению [6, 7], онкологическим заболеваниям [8, 9], формированию фенотипа аутизма [10].

Установление определяющего значения микроорганизмов в формировании и поддержании гомеостаза человека послужило основанием для формирования понятия «суперорганизм» [11, 12], учитывая эволюционно сформировавшиеся связи между макроорганизмом и населяющими его микроорганизмами; геном микробиоты рассматривается как третий основной геном у человека наряду с ядерным и митохондриальным [13] и превышает по объему геном хозяина в 10 раз [14].

Предпринимаются усилия для выяснения сложности композиции микроорганизмов, составляющих уникальную экосистему желудочно-кишечного тракта, его слизистых, эпидермиса, исследуются механизмы регуляции микроорганизмами нормобиоценоза, их участия в инфекционном процессе, выраженности клинических проявлений, исходе заболевания: излечения или хронизации [15]. Особое внимание уделяется микробному составу ротоглотки как прогностическому маркеру стоматологического статуса и ЛОР-патологии [16, 17].

Анализ микробиома полости рта здоровых людей с использованием последних достижений в технологии секвенирования выявил, что большая часть видов бактериальных микроорганизмов у здоровых людей, не состоящих в родстве, идентична [18]. Показано, что наличие микробных ассоциаций и разнообразный состав микрофлоры биотопов полости рта свидетельствуют о нормоценозе и являются благоприятным прогностическим фактором излечения [19, 20]. В то же время

охарактеризованы микроорганизмы и их ассоциации, оказывающие патологическое действие на слизистую ротовой полости, пародонт и ткани зуба. В полости рта выделяют три основных сообщества: а) микроорганизмы, населяющие слизистую оболочку щеки, орговеющую десну и твердое нёбо; б) микроорганизмы, населяющие суб- и супрагингивальные бляшки; в) микроорганизмы, находящиеся в слюне и на языке [21]. Слюна является наиболее удобным объектом изучения и широко используется в клинических исследованиях для выявления корреляции между составом микробиоценоза и развитием местного или системного патофизиологического процесса, в том числе инфекционной природы.

В данном исследовании ставились задачи изучения разнообразия микрофлоры, представленной в ротовой полости, и выявления возможности регуляции микробиоценоза с помощью низкомолекулярных биорегуляторов бактериального происхождения. К числу наиболее изученных низкомолекулярных компонентов бактериальной природы относятся мурамилпептиды. Они представляют собой фрагменты пептидогликана бактерий и реализуют свою активность через NOD2-рецепторы врожденного иммунитета, запуская провоспалительный ответ организма [22]. По современным представлениям NOD2-рецептор является основным рецептором врожденного иммунитета, регулируя активность реакций не только врожденного, но и адаптивного иммунитета [23]. Активация NOD2-рецептора приводит к продукции ИЛ-1, ИЛ-6, интерферона- $\gamma$ , а также дефензинов и кателицидинов – основных факторов противоинфекционного процесса [24]. Показано также влияние мурамилпептидов на представителей микробного сообщества: аналог глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) способствует индукции факторов Rfps у *Micobacterium tuberculosis*, ответственных за выход бактерии из дормантной формы, обеспечивая эффективность химиотерапии туберкулеза [25], что является теоретическим обоснованием полученных ранее на практике результатов эффективного лечения туберкулеза ликолипидом в составе комплексной терапии [26].

## Материал и методы

**Участники исследования.** В исследовании принимали участие 48 здоровых добровольцев в возрасте 18–23 лет: 28 женщин и 20 мужчин. Исследование проходило в Медицинском центре РУДН. У всех участников исследования получено информированное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и обработку персональных данных [27]. *Критерием включения* стало отсутствие заболеваний полости рта, в том числе кариеса и пародонтита, и ЛОР-органов; все пациенты не употребляли антибиотики в последние 2 мес до проведения исследования и во время эксперимента, не курили, не употребляли продукты, содержащие

алкоголь. Материалом для исследования служила ротовая жидкость. 1 мл слюны забирали стерильным шприцем из подъязычной области в стерильные пробирки до применения ГМДП (препарат Ликолипид® 1 мг, АО «Пептек», Москва, Россия) и через 4 дня после 10-дневного курса препарата. Препарат применяли согласно инструкции сублингвально 1 раз в день за 30 мин до еды в течение 10 дней.

**Анализ микробиологического состава ротовой жидкости** проводили с помощью стандартного метода газовой хромато-масс-спектрометрии с определением количественного содержания специфических маркеров: альдегидов, стероинов, карбоновых кислот [28]. Нижний предел чувствительности метода составляет  $10^4$  КОЕ/мл.

**Статистический анализ.** Для сравнения групп использовали непараметрический T-критерий Вилкоксона. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Исследование микрофлоры ротовой жидкости здоровых лиц молодого возраста (18–23 года) до приема иммуномодулятора ГМДП (Ликолипид® 1 мг, 10 дней, 1 раз в день) и через 4 дня после 10-дневного курса показало его влияние на состав микробного пейзажа 30 человек, что составляет 62,5% от общего количества участников исследования (табл.1). У 18 (37,5%) человек отсутствовал статистически значимый эффект ГМДП на микробный состав ротовой жидкости. Состав их микробиоценоза максимально приближался к нормоценозу: отсутствовали представители *Candida albicans* и грам-отрицательной микрофлоры, преобладали *Firmicutes*.

Достоверные изменения обнаружены для грибковой микрофлоры: количество лиц, у которых регистрировался *Candida albicans*, уменьшилось более чем в 5 раз (табл.1), при этом произошло замещение грибковой микрофлоры представителями лактобактерий и бифидобактерий. Статистически значимые изменения также зафиксированы для *Clostridium* spp: после применения ГМДП уменьшение представленности этого микроорганизма уменьшилось почти вдвое. Разнообразие микрофлоры повысилось у 73% молодых людей, основная доля микроорганизмов была представлена *Streptococcus*, *Veillonella*, *Lactobacterium*, *Bifidobacterium*. Наши данные согласуются с результатами других исследований, согласно которым в ротовой жидкости здоровых взрослых преобладающие таксоны принадлежали к *Firmicutes* (род *Streptococcus*; семейство *Veillonellaceae*, род *Granulicatella*), *Proteobacteria* (рода *Neisseria*, *Haemophilus*), *Actinobacteria* (рода *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), *Bacteroidetes*, что дало основание E. Zaura и соавт. [18] выдвинуть концепцию «основного микробиоценоза» в состоянии здоровья. Достоверно уменьшилась обсемененность ротовой полости *Porphyromonas gingivalis*, присутствие которых часто регистрируется при заболеваниях пародонта [29], верхних отделов желу-

Таблица 1. Частота встречаемости микроорганизмов в ротовой жидкости человека (возраст 18–23 года)

Виды микроорганизмов	До приема ГМДП (Ликопид® 1 мг) (n = 48), ротовая жидкость		После приема ГМДП (Ликопид® 1 мг) (n = 48), ротовая жидкость	
	абс.	%	абс.	%
<i>Streptococcus</i> spp.	48	100	48	100
<i>Streptococcus mutans</i>	47	97,92	48	100
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	44	91,66	47	97,92
<i>Veillonella</i> spp.	40	83,33	43	89,58
<i>Candida albicans</i>	28	58,33	5	10,41*
<i>Neisseria</i> spp.	18	37,5	16	33,33
<i>Bifidobacterium</i> spp.	29	60,41	35	72,92*
<i>Eubacterium</i> spp.	5	10,41	7	14,58
<i>Lactobacterium</i> spp.	27	56,25	41	85,42*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	6	12,5	2	4,17*
<i>Clostridium</i> spp.	39	81,25	21	43,75*
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31	64,58	25	58,14*
<i>Actinomyces</i> spp.	19	39,58	26	54,17

Примечание. \* –  $p < 0,05$ .

дочно-кишечного тракта, дыхательных путей, толстой кишки, при болезни Альцгеймера и ревматоидном артрите [30].

Наблюдаемые под действием ГМДП изменения могут быть обусловлены воздействием препарата на иммунную систему человека, а также воздействием на представителей микробного сообщества. Известно, что ГМДП реализует свою активность через NOD2-рецепторы [31]. Поскольку мурамилпептиды – лиганды NOD2-рецептора – консервативны как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий, NOD2 обнаруживает реагирование на большое разнообразие микроорганизмов [32]. Исследованы также другие сенсоры мурамилпептидов, ответственные за реализацию противoinфекционной защиты врожденного иммунитета [33]. Мурамилпептиды эффективны при лечении аллергических заболеваний [34] за счет смещения баланса Th1/Th2 [35], они используются в патогенетической терапии псориаза [36] и коррекции цитопений [37], потенцируют действие цитостатиков в терапии опухолей [38]. Анализ бактерицидной активности ротовой жидкости продемонстрировал эффективность использования препарата ГМДП в терапии заболеваний полости рта у пациентов с дисбактериозом слизистой оболочки [39]. В комплексной терапии пациентов с острыми одонтогенными периоститами [40] выявлена высокая клинико-иммунологическая эффективность ГМДП за счет восстановления параметров иммунного статуса в результате прироста числа Т-хелперов, образования адекватного уровня основных классов иммуноглобулинов и ликвидации дефектов фагоцитарной и микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов.

Эффективность мурамилпептидов и, в частности, ГМДП в коррекции патологий, связанных с иммунной системой, является основанием для широкомасштабных экспериментальных исследований, десятки статей ежегодно публикуются в научных журналах. В то же время

воздействие мурамилпептидов на представителей бактериального сообщества не так широко отражено в научной литературе и, несомненно, представляет интерес. На сегодняшний день факторы, регулирующие состав микробиоценоза ротовой полости, привлекают особое внимание в связи со своей способностью оказывать существенное влияние на возникновение и течение патофизиологического процесса, а также возможностью выступать отягощающим фактором при хирургическом вмешательстве. К изучению этих процессов привлечены эксперты различных специальностей, в том числе системной биомедицины, использующие и формирующие электронные базы данных [41–43], что расширяет возможности экспериментальных и клинических исследований.

## Заключение

Мы получили первое представление о влиянии низкомолекулярных регуляторов бактериального происхождения на состав микробиоценоза ротовой полости, имеющее прогностическое значение не только для диагностики воспалительных заболеваний, но и для разработки эффективных лечебно-профилактических мероприятий. Показано, что профилактическое использование препаратов на основе мурамилпептидов увеличивает разнообразие микрофлоры и уменьшает количество *Candida albicans*, *Clostridium* spp. и *Porphyromonas gingivalis*. Увеличение разнообразия способствует формированию нормобиоценоза, препятствуя заселению ротовой полости патогенной микрофлорой. Исследования в этом направлении представляют несомненный интерес, так как клиницисты получают инструмент целенаправленного регулирования микробного состава ротовой полости, что может быть использовано для терапии заболеваний различной этиологии и профилактики инфекционных осложнений при хирургическом вмешательстве.

## ■ Литература

1. Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*. 2012; 336: 1268–1273.
2. Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006; 124: 837–48.
3. Dethlefsen L., McFall-Ngai M., Relman D.A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007; 449: 811–8.
4. Macpherson A.J., Harris N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 478–85.
5. Lima M. T., Andrade A.C.S.P., Oliveira G.P., Calixto R.S., Oliveira D.B., Souza É.L.S., et al. Microbiota is an essential element for mice to initiate a protective immunity against Vaccinia virus. *FEMS Microbiology Ecology*. 2016; 92 (2); fiv147.
6. Turnbaugh P.J., Backhed F., Fulton L., Gordon J.I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host. Microbe*. 2008; 3: 213–223.
7. Ley R.E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102: 11070–5.
8. Leystra A.A., Clapper M.L. Gut Microbiota Influences Experimental Outcomes in Mouse Models of Colorectal Cancer. *Genes*. 2019; 10 (11) 900: 1–20. doi: <https://doi.org/10.3390/genes10110900>
9. Uronis J.M., Muhlbaauer M., Herfarth H.H., Rubinas T.C., Jones G.S. et al. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS ONE*. 2009; 4: e6026.
10. Buffington S.A., Di Prisco G.V., Auchtung T.A., Ajami N.J., Petrosino J.F., Costa-Mattioli M. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell*. 2016; 165: 1762–1775. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.001
11. Goodacre R. Metabolomics of a superorganism. *J. Nutr.* 2007; 137 (1 Suppl): 259S–66S.
12. Lederberg J. Infectious history. *Science*. 2000; 288 (5464): 287–293.
13. Carroll I.M., Threadgill D.W., Threadgill D.S. The gastrointestinal microbiome: a malleable, third genome of mammals. *Mamm Genome*. 2009; 20 (7): 395–403. doi: 10.1007/s00335-009-9204-7
14. Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., Sunagawa S. et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32: 834–841. doi: 10.1038/nbt.2942
15. Афанасьев С., Алешкин В.А., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Слободенюк В.В., Караулов А.В. Микробиоценозы открытых полостей и мукозальный иммунитет. Эффективная фармако-терапия. 2013; 27: 6–11.
16. Okereke I.C., Miller A.L., Hamilton C.F., Booth A.L., Reep G.L., Andersen C.L., et al. Microbiota of the Oropharynx and Endoscope Compared to the Esophagus. *Sci Rep*. 2019; 9: 10201. doi: 10.1038/s41598-019-46747-y
17. Lemon K.P., Klepac-Ceraj V., Schiffer H.K., Brodie E.L., Lynch S.V., et al. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. *mBio*. 2010; 1 (3): e00129–10. doi: 10.1128/mBio.00129-10.
18. Zaura E., Keijsers B.J., Huse S.M., Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 259. doi: 10.1186/1471-2180-9-259
19. Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю., Нохрин Д.Ю., Тимофеева А.В. Микробный социум экологической ниши: ротовая полость здоровых детей. Инфекция и иммунитет. 2018; 8 (1): 54–60. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-54-60
20. Борисова О.Ю., Алешкин В.А., Пименова А.С., Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Гуров А.В., Шадрин Г.Б., и соавт. Микробный состав микрофлоры ротоглотки у больных с тонзиллярной патологией. Инфекция и иммунитет. 2015; 5 (3): 225–232. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-225-232
21. Segata N., Haake S.K., Mannon P., Lemon K.P., Waldron L., Gevers D., Huttenhower C., Izard J. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* 2012; 13 (6): R42. doi: 10.1186/gb-2012-13-6-r42
22. Girardin S.E., Sansonetti P.J., Philpott D.J. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens-common concepts in mammals and flies *Trends Microbiol.* 2002; 10 (4): 193–9.
23. Negroni A., Pierdomenico M., Cucchiara S., Stronati L. NOD2 and inflammation: current insights. *J. Inflamm. Res.* 2018; 11: 49–60. doi: 10.2147/JIR.S137606
24. Biswas A., Liu Y.J., Hao L., Mizoguchi A., Salzman N.H., Bevins C.L., Kobayashi K.S. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107 (33): 14739–44. doi: 10.1073/pnas.1003363107.
25. Nikitushkin V.D., Demina G.R., Shleeva M.O., Kaprelyants A.S., Guryanova S.V., Ruggiero A., Berisio R. A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria. *FEBS Journal*. 2015; 282 (13): 2500–11.
26. Лугинова Е.Ф., Старостин В.П., Капустина М.И. Клинико-лабораторные проявления инфицирования лекарственно-устойчивыми микобактериями туберкулеза у детей и эффективность комплексного превентивного лечения Дальневосточный медицинский журнал. 2010; (1): 25–8.
27. WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 2013; 310: 2191–2194.
28. Osipov G.A., Boiko N.B., Fedosova N.F., Kasikhina S.A., Lyadov K.V. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2009; 21: 159–171. doi: 10.3109/08910600903462657
29. Naito M., Hirakawa H., Yamashita A. et al. Determination of the Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* Strain ATCC 33277 and Genomic Comparison with Strain W83 Revealed Extensive Genome Rearrangements in *P. gingivalis*. *DNA Research*. 2008; 15 (4): 215–25.
30. Potempa J., Dragunow M., Curtis M.A., Faull R.L.M., Reynolds E.C., Walker G.D., et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*. 2019; 5 (1): eaau3333. doi: 10.1126/sciadv.aau3333
31. Meshcheryakova E., Makarov E., Andronova T., Ivanov V., Philpott D. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophylic derivatives of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl peptides. *Vaccine*. 2007; 25 (23): 4515–20.
32. Al Nabhani Z., Dietrich G., Hugot J.P., Barreau F. Nod2: The intestinal gate keeper. *PLoS Pathog.* 2017; 13 (3): e1006177. doi: 10.1371/journal.ppat.1006177
33. Laman A.G., Lathe R., Shepelyakovskaya A.O., Gartseva A., Brovko F.A., Guryanova S., et al. Muramyl peptides activate innate immunity conjointly via YB1 and NOD2. *Innate Immun.* 2016; 30: 41–49. doi: 10.1177/1753425916668982
34. Колесникова Н.В., Козлов И.Г., Гурьянова С.В., Коков Е.А., Андропова Т.М. Клинико-иммунологическая эффективность и перспективы использования мурамилдипептидов в лечении atopических заболеваний. *Медицинская иммунология*. 2016; 18 (1): 15–20.
35. Гурьянова С.В., Козлов И.Г., Мещерякова Е.А., Алексеева Л.Г., Андропова Т.М. Глюкозаминилмурамилдипептид нормализует баланс Th1/Th2 при atopической бронхиальной астме. *Иммунология*. 2009; (5): 305–8.
36. Guryanova S., Udzhukhu V., Kubylynsky A. Pathogenetic therapy of psoriasis by muramyl peptide. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 1275–83. doi: 10.3389/fimmu.2019.01275
37. Манапова Э.Р., Фазылов В.Х., Гурьянова С.В. Цитопении и их коррекция при противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов с генотипом 1. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62 (4): 174–8.
38. Козлов И.Г., Воронина Е.В., Валякина Т.И., Симонова М.А., Гурьянова С.В., Мещерякова Е.А., Андропова Т.М. Ликопид в иммунотерапии опухолей: обзор экспериментальных исследований (обзор литературы). *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2011; 10 (2): 32–8.
39. Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Абрамова Е.С. Применение ликопида в комплексной терапии дисбактериоза полости рта. *Стоматология*. 2013; 92 (1): 40–2.
40. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Неделько Н.А. Способ иммунокоррекции ликопидом нарушений местного иммунитета у больных с острыми одонтогенными периоститами. *Стоматолог-практик*. 2006; 12 (148): 30–1.
41. Guryanova S.V., Guryanova A.S. Modern Approach to Systems Biology, chapter in: *Biological Networks and Pathway Analysis*. Springer / Eds.: Tatarinova T.V., Nikolsky Yu., Nikolsky

Yu. Publ. Humana Press Inc., Totowa, NJ, United States. 2017. doi: 10.1007/978-1-4939-7027-8\_2

42. Namasivayam A.A., Peitsch M.C., Racero M.G., Biryukov M., Talikka M., Pérez M.B. et al. Community-Reviewed Biological Network Models for Toxicology and Drug Discovery Applications.

## References

1. Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*. 2012; 336: 1268–73.
2. Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006; 124: 837–48.
3. Dethlefsen L., McFall-Ngai M., Relman D.A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007; 449: 811–8.
4. Macpherson A.J., Harris N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 478–85.
5. Lima M. T., Andrade A.C.S.P., Oliveira G.P., Calixto R.S., Oliveira D.B., Souza É.L.S., et al. Microbiota is an essential element for mice to initiate a protective immunity against Vaccinia virus. *FEMS Microbiology Ecology*. 2016; 92 (2): fiv147.
6. Turnbaugh P.J., Backhed F., Fulton L., Gordon J.I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008; 3: 213–23.
7. Ley R.E., et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102: 11070–5.
8. Leystra A.A., Clapper M.L. Gut Microbiota Influences Experimental Outcomes in Mouse Models of Colorectal Cancer. *Genes*. 2019; 10 (11) 900; 1–20. doi: <https://doi.org/10.3390/genes10110900>
9. Uronis J.M., Muhlbauer M., Herfarth H.H., Rubinas T.C., Jones G.S., et al. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS ONE*. 2009; 4: e6026.
10. Buffington S.A., Di Prisco G.V., Auchtung T.A., Ajami N.J., Petrosino J.F., Costa-Mattioli M. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell*. 2016; 165: 1762–75. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.001
11. Goodacre R. Metabolomics of a superorganism. *J. Nutr.* 2007; 137 (1 Suppl): 259S–66S.
12. Lederberg J. Infectious history. *Science*. 2000; 288 (5464): 287–93.
13. Carroll I.M., Threadgill D.W., Threadgill D.S. The gastrointestinal microbiome: a malleable, third genome of mammals. *Mamm. Genome*. 2009; 20 (7): 395–403. doi: 10.1007/s00335-009-9204-7
14. Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., Sunagawa S., et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32: 834–41. doi: 10.1038/nbt.2942
15. Afanasyev S., Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Afanasyev M.S., Slobodenyuk V.V., Karaulov A.V. Microbiocenoses of open cavities and mucosal immunity. *Effective pharmacotherapy*. 2013; 27: 6–11. (in Russian)
16. Okereke I.C., Miller A.L., Hamilton C.F., Booth A.L., Reep G.L., Andersen C.L., et al. Microbiota of the Oropharynx and Endoscope Compared to the Esophagus. *Sci Rep*. 2019; 9: 10201. doi: 10.1038/s41598-019-46747-y
17. Lemon K.P., Klepac-Ceraj V., Schiffer H.K., Brodie E.L., Lynch S.V., et al. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. *mBio*. 2010; 1 (3): e00129–10. doi: 10.1128/mBio.00129-10
18. Zaura E., Keijsers B.J., Huse S.M., Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 259. doi: 10.1186/1471-2180-9-259
19. Burmistrova A.L., Filippova Yu.Yu., Nokhrin D.Yu., Timofeeva A.V. Microbial society of environmental niche: oral cavity of the healthy children. *Russian Journal of Infection and Immunity. Infection and immunity*. 2018; 8 (1): 54–60. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-54-60
20. Borisova O.Yu., Aleshkin V.A., Pimenova A.S., Krukov A.I., Kunelskaya N.L., Gurov A.V., et al. Microbial landscape of microflora of a pharynx at patients with tonsillitis pathology. *Russian Journal of Infection and Immunity. Infection and immunity*. 2015; 5 (3): 225–32. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-225-232 (in Russian)
21. Segata N., Haake S.K., Mannon P., Lemon K.P., Waldron L., Gevers D., et al. Composition of the adult digestive tract bacterial mi-

Gene Regulation and Systems Biology. 2016; 10: 51–66. doi: 10.4137/GRSB.S39076

43. Peterson D.A., Frank D.N., Pace N.R., Gordon J.I. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host. Microbe*. 2008; 3: 417–427.

- crobiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol*. 2012; 13 (6): R42. doi: 10.1186/gb-2012-13-6-r42
22. Girardin S.E., Sansonetti P.J., Philpott D.J. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens-common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* 2002; 10 (4): 193–9.
23. Negroni A., Pierdomenico M., Cucchiara S., Stronati L. NOD2 and inflammation: current insights. *J. Inflamm Res.* 2018; 11: 49–60. doi: 10.2147/JIR.S137606
24. Biswas A., Liu Y.J., Hao L., Mizoguchi A., Salzman N.H., Bevins C.L., Kobayashi K.S. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107 (33): 14739–44. doi: 10.1073/pnas.1003363107
25. Nikitushkin V.D., Demina G.R., Shleeva M.O., Kaprelyants A.S., Guryanova S.V., Ruggiero A., Berisio R. A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria. *FEBS Journal*. 2015; 282 (13): 2500–11.
26. Luginova E.F., Starostin V.P., Kapustina M.I. Clinical and laboratory manifestations of infection with drug-resistant mycobacterium tuberculosis in children and the effectiveness of comprehensive preventive treatment. *Far Eastern Medical Journal*. 2010. (1): 25–28. (in Russian)
27. WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 2013; 310: 2191–4.
28. Osipov G.A., Boiko N.B., Fedosova N.F., Kasikhina S.A., Lyadov K.V. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2009; 21: 159–71. doi: 10.3109/08910600903462657
29. Naito M., Hirakawa H., Yamashita A., et al. Determination of the Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* Strain ATCC 33277 and Genomic Comparison with Strain W83 Revealed Extensive Genome Rearrangements in *P. gingivalis*. *DNA Research*. 2008; 15 (4): 215–25.
30. Potempa J., Dragunow M., Curtis M.A., Faull R.L.M., Reynolds E.C., Walker G.D., et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*. 2019; 5 (1): eaau3333. doi: 10.1126/sciadv.aau3333
31. Meshcheryakova E., Makarov E., Andronova T., Ivanov V., Philpott D. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophilic derivatives of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl peptides. *Vaccine*. 2007; 25 (23): 4515–20.
32. Al Nabhani Z., Dietrich G., Hugot J.P., Barreau F. Nod2: The intestinal gate keeper. *PLoS Pathog.* 2017; 13 (3): e1006177. doi: 10.1371/journal.ppat.1006177
33. Laman A.G., Lathe R., Shepelyakovskaya A.O., Gartseva A., Brovko F.A., Guryanova S., et al. Muramyl peptides activate innate immunity conjointly via YB1 and NOD2. *Innate Immun.* 2016; 30: 41–9. doi: 10.1177/1753425916668982
34. Kolesnikova N.V., Kozlov I.G., Guryanova S.V., Kokov E.A., Andronova T.M. Clinical and immunological efficacy and prospects for the use of muramyl dipeptides in the treatment of atopic diseases. *Medical immunology*. 2016. 18 (1): 15–20. (in Russian)
35. Guryanova S.V., Kozlov I.G., Meshcheryakova E.A., Alekseeva L.O., Andronova T.M. Investigation into the influence of glucosaminylmuramyl dipeptide on the normalization of Th1/Th2 balance in patients with atopic bronchial asthma. *Immunologiya*. 2009; (5): 305–8. (in Russian)
36. Guryanova S., Udzhukhu V., Kubylnsky A. Pathogenetic therapy of psoriasis by muramyl peptide. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 1275–83. doi: 10.3389/fimmu.2019.01275
37. Manapova E.R., Fazylov V.Ch., Guryanova S.V. Cytopenias and their correction during antiviral therapy of chronic hepatitis C in patients with genotype 1. *Problems of Virology, Russian journal*. 2017; 62 (4): 174–8. (in Russian)
38. Kozlov I.G., Voronina E.V., Valyakina T.I., Simonova M.A., Guryanova S.V., Meshcheryakova E.A., Andronova T.M. Lycopid in tumor immunotherapy: a review of experimental studies (literature re-

view). Questions of hematology / oncology and immunopathology in pediatrics. 2011; 10 (2): 32–8. (in Russian)

39. Rabinovich O.F., Rabinovich I.M., Abramova E.S. The use of lycopide in the treatment of dysbiosis of the oral cavity. Dentistry. 2013; 92 (1): 40–2. (in Russian)

40. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Nedelko N.A. Method for immunocorrection of lycopide with local immunity disorders in patients with acute odontogenic periostitis. Dentist practitioner. 2006; 12 (148): 30–1. (in Russian)

41. Guryanova S.V., Guryanova A.S. Modern Approach to Systems Biology, chapter in: Biological Networks and Pathway Analy-

sis. Springer/Eds.: Tatarinova T.V., Nikolsky Yu. Publ. Humana Press Inc., Totowa, NJ, United States. 2017. doi: 10.1007/978-1-4939-7027-8\_2

42. Namasivayam A.A., Peitsch M.C., Racero M.G., Biryukov M., Talikka M., Pérez M.B., et al. Community-Reviewed Biological Network Models for Toxicology and Drug Discovery Applications. Gene Regulation and Systems Biology. 2016; 12 (10): 51–66. doi: 10.4137/GRSB.S39076

43. Peterson D.A., Frank D.N., Pace N.R., Gordon J.I. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Cell Host. Microbe. 2008; 3: 417–27.

## Методы

© Коллектив авторов, 2019

Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В.

### Цитометрическая оценка связывания лектинов с различными популяциями тимоцитов мыши

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» Минобрнауки России, 197376, г. Санкт-Петербург, Россия

#### Резюме

**Актуальность.** Работа посвящена оценке возможности использования лектинов для типирования лимфоидных и нелимфоидных клеток тимуса, а также разделения тимоцитов на субпопуляции.

**Материал и методы.** В работе использованы 23 лектина, меченых флюоресцеинизотиоцианатом. Исследование проведено на тимоцитах 80 самок мышей линии СВА методом проточной цитометрии.

**Результаты.** Установлено, что ни один лектин не пригоден для идентификации нелимфоидных клеток тимуса, при этом результаты окрашивания лектинами подснежника и амариллиса практически точно соответствовали результатам использования антител к антигену CD45. Также ни один из лектинов не обеспечивал избирательного связывания с тимоцитами на любом из этапов их дифференцировки, хотя лектины виноградной улитки и белоцветника, но не арахиса, преимущественно связывались с незрелыми клетками.

**Заключение.** По-видимому, применение лектинов для типирования тимоцитов ограничивается областью сравнительной иммунологии и ветеринарии в случае отсутствия соответствующих моноклональных антител.

**Ключевые слова:** тимус; тимоциты; клетки стромы; субпопуляции тимоцитов; лектины; моноклональные антитела; проточная цитометрия

Статья поступила 02.08.2019. Принята в печать 16.10.2019.

**Для цитирования:** Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В. Цитометрическая оценка связывания лектинов с различными популяциями тимоцитов мыши. Иммунология. 2019; 40 (6): 41–49. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16006

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Polevshchikov A.V.

### Cytometric assessment of lectins binding to various populations of murine thymocytes

Institute of Experimental Medicine, Ministry of High Education and Science of the Russian Federation, 197376, Saint Petersburg, Russia

#### Abstract

**Background.** The work is devoted to assessing the possibility of using lectins for typing lymphoid and non-lymphoid thymus cells, as well as the separation of thymocytes into subpopulations.

**Material and methods.** 23 FITC-labeled lectins were used in the work. The study was performed on thymocytes of 80 female CBA mice by flow cytometry.

**Results.** It was found that not one lectin is suitable for identification of non-lymphoid thymus cells, while the results of snowdrop (GNA) and amaryllis (HHA) lectin staining almost exactly corresponded to the results of using antibodies to the CD45 antigen. None of the lectins also provided selective binding to thymocytes at any of the stages of their differentiation, although the lectins of the Roman snail (HPA) and leucojum spring (LVA), but not peanuts (PNA), mainly associated with immature cells.

#### Для корреспонденции

Полевщиков Александр Витальевич –  
доктор биологических наук,  
профессор,  
заведующий отделом иммунологии  
ФГБНУ «Институт экспериментальной  
медицины» Минобрнауки России,  
Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-3342-178X>

#### For correspondence

Polevshchikov Alexander V. –  
Dr. Sci., PhD, Professor,  
Head of the Department of Immunology,  
Institute of Experimental Medicine,  
Ministry of High Education and Science  
of the Russian Federation,  
E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-3342-178X>

**Conclusion.** Apparently, the use of lectins for typing thymocytes is limited to the field of comparative immunology and veterinary medicine in the absence of the corresponding monoclonal antibodies.

**Keywords:** thymus; thymocytes; stromal cells; subpopulations of thymocytes; lectins; monoclonal antibodies; flow cytometry

Received 02.08.2019. Accepted 16.10.2019.

**For citation:** Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Polevshchikov A.V. Cytometric assessment of lectins binding to various populations of murine thymocytes. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 41–9. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16006

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

## Введение

Изменение поверхностного фенотипа в процессе дифференцировки играет ключевую роль в дальнейшей судьбе клетки. Исследование молекул, представленных на поверхности клеток, очень важно для понимания различных физиологических процессов, в том числе процесса созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе. Однако если для человека и мыши в распоряжении исследователей имеется целый ряд коммерческих реагентов (моноклональных антител, МкАт), предназначенных для цитометрических и иммуногистохимических исследований, то переход практически к любому другому объекту сопряжен с существенными методическими трудностями.

В ходе созревания и дифференцировки тимоцитов изменяется не только состав белковых рецепторов и маркеров плазматической мембраны, но и ее углеводная компонента. Комплексные молекулы гликопротеинов и гликолипидов отвечают за разнообразные взаимодействия клетки и ее окружения [1]. Почти все ключевые молекулы, вовлеченные в реакции врожденного и приобретенного иммунитета, являются гликопротеинами, а такие процессы, как дифференцировка, активация и миграция, сопровождаются запрограммированным изменением состава углеводов на поверхности иммунокомпетентных клеток [2–4]. Углеводные компоненты молекул, задействованных в распознавании антигена, возможно, выполняют функцию позиционирования Т-клеточных рецепторов и молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС). Кроме того, углеводы способствуют стабилизации отдельных белковых молекул, ограждая их от действия протеаз [5, 6].

Формирование углеводных компонент клетки осуществляется за счет работы гликозилтрансфераз и гликозидаз – высокоспецифичных ферментов, избирательно модифицирующих углеводные структуры на поверхности клетки за счет добавления или удаления отдельных моносахаридов. Гены этих белков составляют более 1% всего генома, а их экспрессия четко регулируется в соответствии с клеточным метаболизмом, активацией, изменением микроокружения и возрастом [7, 8]

Исследование углеводных компонентов мембраны является очень важным шагом к пониманию многих процессов, происходящих в клетке. Одним из подходов к изучению изменения экспрессии тех или иных углеводных детерминант является использование широко распространенных в природе белков, получившим название лектинов, которые можно описать как углевод-связывающие белки или гликопротеины неиммунной природы, агглютинирующие или преципитирующие гликоконъюгаты, локализованные на клеточных поверхностях.

Как и при использовании антител, для визуализации связывания лектинов с молекулами-мишенями используются их конъюгаты с флюоресцентными красителями, ферментами (например, пероксидазой хрена), биотином, ферритином или частицами золота. При этом лектины могут использоваться при работе как с суспензиями клеток, так и с гистологическими срезами. Кроме того, благодаря способности лектинов к агглютинации, возможно их использование для выделения тех или иных популяций клеток [9].

Одним из первых лектинов, использованных для выделения различных популяций тимоцитов, был лектин арахиса (PNA). Данный лектин было предложено использовать для выделения популяции незрелых кортикальных тимоцитов, чувствительных к действию радиации и стероидных гормонов [10]. Для лектина соевых бобов (SBA) описано связывание с популяцией крупных blastov в субкапсулярной зоне тимуса [11], а также с В-лимфоцитами мыши [12].

Для типирования разных популяций тимоцитов также использовали лектины бузины черной (SNA) и акации амурской (MAA), специфичные к различным сиаловым кислотам (NeuNAc  $\alpha$ 2,6-Gal и NeuNAc  $\alpha$ 2,3-Gal) [13]. С помощью лектиногистохимии было показано, что тимоциты, окрашенные лектином SNA, располагаются преимущественно в центральной части кортекса. Единичные позитивные по SNA клетки обнаруживаются также в медулле и на кортикально-медуллярной границе. Позитивные по лектину амурской акации (MAA) клетки, напротив, сконцентрированы в медулле и в небольшом количестве присутствуют на границе с кортексом.

До разработки и повсеместного внедрения технологии МкАт лектины различной углеводной специфичности широко использовались для изучения углеводных детерминант, присутствующих на поверхности клеток тимуса на различных стадиях их созревания, и гликопротеинов, в состав которых они входят. Кроме того, разрабатывались методики использования различных лектинов для типирования клеток тимического микроокружения и исследования влияния лекарственных препаратов на структуру гликокаликса клеток тимуса [14–18]. В настоящее время в практике медико-биологических исследований лектины используются нечасто, однако для разработки методов типирования субпопуляций тимоцитов в рамках сравнительно-иммунологических и ветеринарных исследований они могут быть по-прежнему пригодны. Другой актуальной задачей является оценка эффективности использования лектинов по сравнению с МкАт в проточной цитометрии как наиболее распространенном методе типирования клеточных популяций в современной иммунологии. В связи с этим **целью** данной работы стало изучение взаимодействия лектинов с различными популяциями тимоцитов и возможности их использования для типирования клеток тимуса и идентификации клеток стромы в ходе цитометрического анализа.

## Материал и методы

**Животные.** В качестве объектов исследования были использованы самки мышей линии СВА массой 18–20 г, полученные из питомника «Рапполово», в количестве 80 шт. Животных содержали в стандартных условиях по температуре и освещенности при неограниченном доступе к воде и пище. Условия содержания, экспериментальной работы и вывода животных из эксперимента полностью соответствовали Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986) и российскому законодательству (ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» от 01.07.2016).

**Лектины.** В работе исследовали 23 лектина различной углеводной специфичности. Все меченые флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) лектины в растворе (табл. 1) были приобретены у НПК «ЛектиноТест» (Украина).

**Выделение тимоцитов и пробоподготовка.** Тимусы мышей выделяли после цервикальной дислокации и с помощью гомогенизатора Поттера немедленно получали клеточную суспензию. Индивидуальные клеточные суспензии фильтровали через нейлоновый фильтр и дважды отмывали избытком 0,14 М раствора NaCl, забуференного фосфатами, pH 7,2–7,4 (забуференный физиологический раствор, ЗФР) путем центрифугирования при 330g в течение 8 мин при охлаждении до 15 °С. Клеточный осадок ресуспендировали и переводили в 3 мл ЗФР.

Для оценки возможности связывания различных лектинов с популяциями тимоцитов к 100 мкл суспензии клеток добавляли по 10 мкл раствора лектина, получая финальную концентрацию лектина 50 мкг/мл. Затем

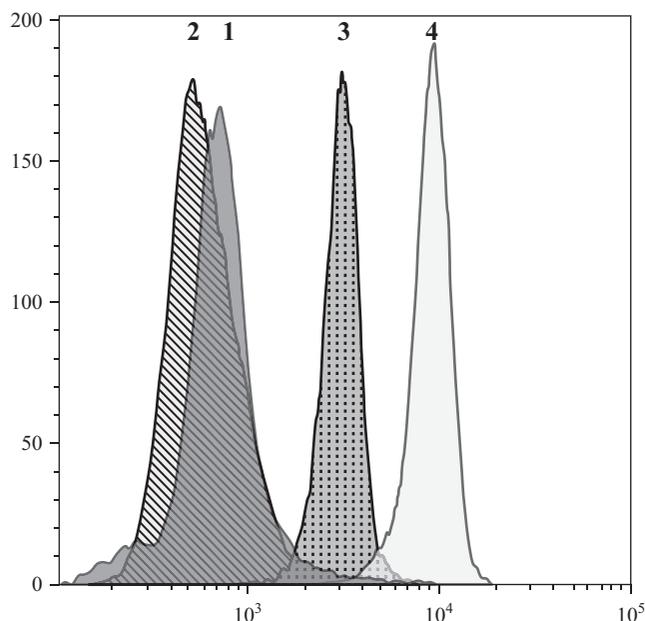
в пробу добавляли МкАт против мышинных антигенов CD4 (меченые PE/Cy5, clone GK1.5), CD8 (меченые PE/Cy7, clone 53-6.7) и CD45 (меченые APC/Cy7, clone 30-F11; все МкАт производства BioLegend, США). Окраску антителами производили в соответствии с инструкцией производителя в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Контрольную пробу окрашивали только антителами без добавления лектинов. После окрашивания образцы отмывали избытком ЗФР с добавлением 2% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург), полученный осадок ресуспендировали в 300 мкл ЗФР и анализировали на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 30000 одиночных клеток, исключая из анализа клеточные агрегаты. Полученный по итогам цитометрического учета результат выражали числом процентов позитивных по лектину тимоцитов каждой популяции.

**Статистические методы.** В работе применяли следующие статистические методы: вычисление средних арифметических и ошибки среднего, определение нормальности распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. Сравнение выборок производили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Обработку данных вели при помощи пакета программ и приложений Microsoft Office

**Таблица 1.** Используемые в работе лектины и их специфичность

Лектин из...	Международное обозначение	Лигандная специфичность
коры акации желтой	CABA	DGalNAc
канавалии мечевидной	ConA	$\alpha$ DMan/ $\alpha$ DGlc
крокуса	CVA	$\alpha$ DMan
подснежника	GNA	$\alpha$ DMan
амариллиса	HNA	$\alpha$ DMan
виноградной улитки	HPA	$\alpha$ DGalNAc
коры бобовника анаги-ролистного	LABA	$\alpha$ LFuc
семян лимской фасоли	LBA	DGalNAc
семян чечевицы	LCA	$\alpha$ DMan/ $\alpha$ DGlc
белоцветника весеннего	LVA	$\alpha$ DMan/ $\alpha$ DGlc
банана	MBA	$\alpha$ DMan
нарцисса	NPA	$\alpha$ DMan
семян фасоли	PHA-E	$\beta$ GlcNAc
купены многоцветной	PMRA	$\alpha$ DMan
семян арахиса	PNA	$\beta$ DGal
семян гороха	PSA	$\alpha$ DMan/ $\alpha$ DGlc
семян клещевины	RCA	$\beta$ DGal
коры бузины черной	SNA	NeuNAc
коры бузины красной	SRA	NeuNAc
клубней картофеля	STA	DGlcNAc
корня крапивы	UDA	DGlcNAc
омелы белой	VAA	$\beta$ DGal
зародышей пшеницы	WGA	DGlcNAc

**Примечание.** Gal – галактоза; Glc – глюкоза; Man – манноза; NAc.



**Рис. 1.** Связывание лектинов подснежника (GNA), амариллиса (HNA) и омелы белой (VAA) с CD45<sup>+</sup>-клетками тимуса мыши. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции лектинов, конъюгированных с ФИТЦ, усл. ед., по оси ординат – количество клеток. 1 – неокрашенный образец; 2 – клетки, окрашенные VAA; 3 – клетки, окрашенные HNA; 4 – клетки, окрашенные GNA.

Excel (Microsoft, США). Во всех экспериментах различия между контролем и опытом считались статистически достоверными только для  $p < 0,05$ .

## Результаты

**Оценка возможности использования лектинов для идентификации клеток стромы тимуса мыши.** Анализ связывания лектинов с различными клетками тимуса показал, что ни один из лектинов использованной панели не окрашивает клетки стромы, негативные по маркеру CD45, и, следовательно, не может быть использован для их идентификации (табл. 2). Количество позитивных по лектину клеток стромы для всех лектинов, кроме лектина зародышей пшеницы (WGA), не достигает 1% от общего количества проанализированных клеток. Клетки стромы, позитивные по лектину WGA, составляют лишь  $4,9 \pm 2,2\%$  от общего количества тимоцитов при контрольном значении негативных по CD45 клеток, равно  $19,0 \pm 0,3\%$ , что ведет к достоверности отличий от контроля ( $t = 6,3, p < 0,001$ ).

Количество клеток лимфоидного ряда (CD45<sup>+</sup>), демонстрирующих флуоресценцию по зеленому каналу (лектин-ФИТЦ), сильно варьирует. Если для лектинов банана (MBA) и омелы белой (VAA) число связавших лектин клеток не превышает 1%, то для лектинов подснежника (GNA) и амариллиса (HNA) оно равно, соответственно,  $83,6 \pm 5,5\%$  и  $83,3 \pm 4,4\%$ , что достоверно

не отличается от контроля (% CD45<sup>+</sup>) и указывает на возможность использования этих лектинов для типирования тимоцитов мыши (рис. 1). Менее выраженное, но все же заметное связывание демонстрируют лектины арахиса –  $66,4 \pm 3,1\%$ , виноградной улитки –  $44,8 \pm 5,7\%$ , зародышей пшеницы –  $28,0 \pm 4,9\%$ , а также лектины коры бузины красной –  $15,3 \pm 7,2\%$  и крокуса –  $12,3 \pm 2,4\%$ . Для остальных лектинов количество связавшихся с ними тимоцитов варьирует в диапазоне от 2,5 до 8,5%, что при контрольном значении CD45<sup>+</sup>-клеток, равно  $81,1 \pm 0,3\%$ , указывает на выявление этими лектинами лишь небольшой части популяции лимфоидных клеток тимуса и нецелесообразность использования этих белков для типирования тимоцитов мыши (см. табл. 2).

**Оценка возможности использования лектинов для разделения CD45<sup>+</sup>-клеток тимуса мыши на субпопуляции.** Данные, полученные в результате совместного окрашивания тимоцитов мыши лектинами и антителами к антигенам CD4 и CD8, приведены в табл. 3. Из приведенных результатов видно, что практически все лектины в разной степени взаимодействуют с тимоцитами всех основных популяций, однако количество позитивных по лектинам клеток различных популяций сильно варьирует.

Лектин подснежника (GNA) демонстрирует максимально близкое к контролю связывание со всеми популяциями тимоцитов мыши (см. табл. 3). В литературе не удалось найти других свидетельств использования этого лектина для типирования тимоцитов мыши и проявленного им свойства к связыванию всех CD45<sup>+</sup>-клеток тимуса, и хотя данный результат полностью совпадает с данными табл. 2, он требует дополнительной экспериментальной проверки. Весьма схожие с GNA свойства показал лектин амариллиса (HNA). Другой интересной находкой стало свойство лектина банана (MBA) связываться со значительной частью субпопуляции DN [double negative cells – дважды негативные (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) незрелые тимоциты] при низком связывании с другими субпопуляциями. Однако на долю DN приходится всего около 1% всей популяции CD45<sup>+</sup>-timoцитов, в то время как на долю субпопуляции DP [double positive cells – дважды позитивные (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) тимоциты] приходится около 90% от числа CD45<sup>+</sup>-timoцитов, связывание всего с  $7,1 \pm 1,7\%$  субпопуляции DP способно полностью замаскировать меченые MBA DN-timoциты, что ставит под вопрос возможность использования лектина банана для идентификации самых незрелых клеток тимуса мыши (см. табл. 3).

Отдельного внимания заслуживают лектины арахиса (PNA) и виноградной улитки (HPA) как многократно упомянутые ранее в литературе инструменты для типирования лимфоцитов [19]. Несмотря на различную лигандную специфичность ( $\alpha$ DMan в случае GNA и  $\beta$ DGal в случае PNA), лектин арахиса во многом повторяет характер связывания, описанный выше для лектина подснежника, за исключением взаимодействия с меньшей долей DP, поэтому потенциально при-

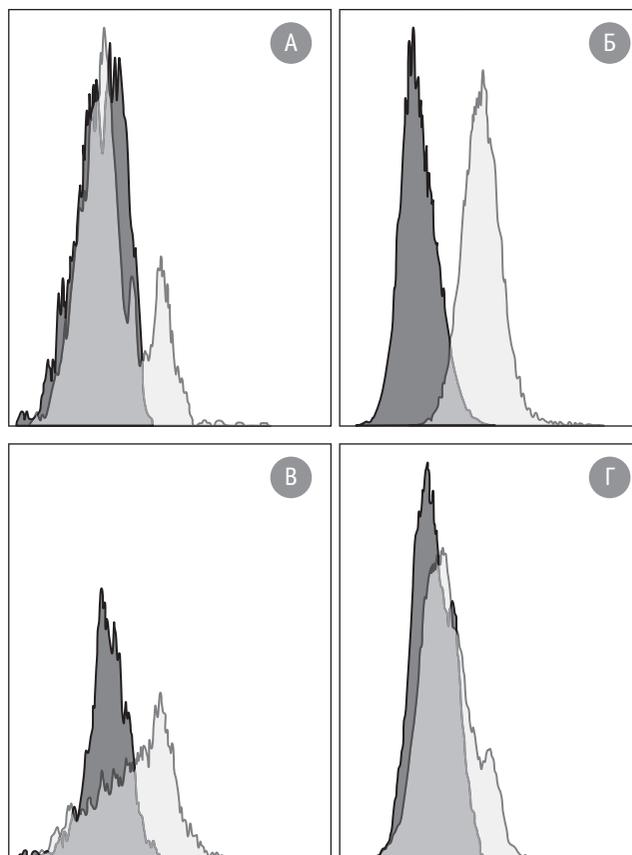
**Таблица 2.** Взаимодействие лектинов с лимфоидными (CD45<sup>+</sup>) и нелимфоидными (CD45<sup>-</sup>) клетками тимуса, % от общего количества клеток,  $X \pm s$ ,  $n \geq 8$  по каждой точке

Лектин	CD45 <sup>+</sup> -timoциты	CD45 <sup>-</sup> -timoциты
Без лектина	81,1±0,3	19,0±0,3
САВА	8,4±2,9	0,8±0,2
СonA	4,7±1,6	0,2±0,1
СVA	12,3±2,4	0,1±0,1
GNA	83,6±5,5	0,6±0,1
ННА	83,3±4,4	0,4±0,1
НРА	44,8±5,7	0,3±0,1
ЛАВА	4,6±1,5	0,2±0,1
ЛВА	5,2±2,0	0,3±0,1
ЛСА	3,7±0,6	0,3±0,1
ЛВА	3,2±1,3	0,3±0,1
МВА	1,0±0,1	0,3±0,2
NPA	6,4±2,8	0,2±0,1
PHA-E	7,3±1,7	0,6±0,3
PMRA	2,5±0,7	0,1±0,1
PNA	66,4±3,1	0,5±0,1
PSA	5,0±1,2	0,1±0,1
RCA	4,9±1,3	0,2±0,1
SNA	7,2±2,5	0,4±0,1
SRA	15,3±7,2	0,4±0,2
STA	3,4±0,6	0,2±0,1
UDA	4,8±1,3	0,3±0,1
VAA	0,6±0,3	0,1±0,1
WGA	28,0±4,9	4,9±2,2

**Примечание.** Здесь и в табл. 3: серый фон ячеек – случаи отсутствия достоверных различий от окрашивания МкАт (без лектинов);  $p > 0,05$ .

годен для идентификации и выделения CD45<sup>+</sup>-клеток, но не для разделения тимоцитов на субпопуляции. Несколько иной характер связывания обнаружен для лектина виноградной улитки НРА: за счет слабого связывания с обеими субпопуляциями SP-timoцитов (single positive cells – позитивные по CD4 или по CD8 зрелые тимоциты) он может выявлять суммарную фракцию DN и DP при очень небольшой примеси обеих субпопуляций SP (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что PNA и НРА потенциально могут быть использованы для идентификации незрелых CD45<sup>+</sup>-клеток тимуса.

Для всех остальных лектинов процент связывания с клетками различных популяций варьировал в достаточно широком диапазоне, однако можно проследить общую закономерность: как правило, объем связанной лектинами доли субпопуляции для DN-timoцитов гораздо выше, чем для DP-timoцитов (см. табл. 3). Более того, на основании приведенных результатов можно утверждать, что лектины потенциально пригодны для



**Рис. 2.** Связывание лектина виноградной улитки (НРА) с различными популяциями тимоцитов мыши

По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции НРА, конъюгированного с ФИТЦ, усл. ед.; по оси ординат – количество клеток. А – CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-timoциты; Б – CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-timoциты; В – CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-timoциты; Г – CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-timoциты. Светлый пик – клетки, окрашенные НРА; темный пик – биологический контроль – клетки, окрашенные VAA, показавшим фоновое связывание (см. рис. 1).

выявления незрелых (DN и DP) тимоцитов, но ни один из использованных лектинов не связывается с популяциями зрелых SP-timoцитов сильнее, чем с незрелыми клетками. Этот факт наряду с очень слабым связыванием лектинов с высокоспециализированными нелимфоидными CD45<sup>-</sup>-клетками стромы (см. табл. 2) позволяет предполагать, что по мере специализации любых тимоцитов (лимфоидных и нелимфоидных) плотность гликокаликсовых структур на клетке снижается.

Одним из немногих лектинов, который почти избирательно связывается с одной из субпопуляций тимоцитов, является лектин белоцветника LVA: он при фоновом связывании с тремя субпопуляциями обладает слабым, но все же выраженным связыванием с DP-клетками. Наконец, интересным свойством обладает лектин зародышей пшеницы WGA, который также упоминался в литературе как возможный инструмент для выделения субпопуляций Т-лимфоцитов [19]. Он выявляет практически всю популяцию DN, а также CD8<sup>+</sup>-SP на том же уровне, что и соответствующие МкАт

**Таблица 3.** Связывание лектинов (lectin<sup>+</sup>) с различными CD45<sup>+</sup>-популяциями тимоцитов мыши, % от общего числа CD45<sup>+</sup>-timoцитов,  $X \pm s$ ,  $n \geq 4$  по каждой точке

Лектин	DN	DP	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Без лектинов	1,1±0,1	89,2±0,6	7,2±0,6	1,2±0,3
САВА	0,2±0,1	6,1±1,2	0,8±0,3	0,2±0,1
ConA	0,4±0,1	5,2±1,9	0,7±0,3	0,2±0,1
СVA	0,4±0,1	10,8±4,3	1,0±0,3	0,2±0,1
GNA	1,0±0,3	89,4±0,8	6,0±0,6	1,0±0,1
ННА	0,8±0,3	79,3±3,6	8,7±2,2	1,0±0,2
НРА	0,8±0,1	57,0±12,4	2,2±0,5	0,3±0,1
LABA	0,2±0,1	7,4±2,2	0,9±0,3	0,2±0,1
LBA	0,1±0,1	4,3±0,9	0,6±0,1	0,1±0,1
LCA	0,1±0,1	2,1±0,6	0,3±0,1	0,1±0,1
LVA	0,1±0,1	0,7±0,3	0,1±0,1	0,1±0,0
MBA	0,8±0,3	7,1±1,7	1,7±0,5	0,4±0,2
NPA	0,1±0,1	2,0±0,6	0,1±0,1	0,0±0,0
PHA-E	0,6±0,1	10,4±3,1	1,3±0,3	0,3±0,1
PMRA	0,2±0,1	2,8±0,5	0,3±0,1	0,1±0,1
PNA	1,1±0,1	75,9±2,4	4,5±1,1	0,7±0,1
PSA	0,5±0,2	6,0±2,2	1,0±0,2	0,2±0,1
RCA	0,4±0,2	12,8±3,3	0,9±0,2	0,2±0,1
SNA	0,4±0,1	26,7±19,6	2,8±1,8	0,3±0,1
SRA	0,5±0,1	15,8±4,7	1,2±0,4	0,2±0,1
STA	0,1±0,1	2,7±0,8	0,4±0,1	0,1±0,1
UDA	0,3±0,1	4,0±1,2	0,9±0,3	0,2±0,1
VAA	0,1±0,1	1,3±1,0	0,2±0,2	0,1±0,1
WGA	0,9±0,2	34,6±4,0	3,3±0,7	0,6±0,2

(см. табл. 3), однако и в этом случае заметное связывание с самыми многочисленными DP-timoцитами (около 35%) резко снижает возможности практического применения лектина зародышей пшеницы (рис. 3).

### Обсуждение

Полученные в ходе работы результаты во многом подтверждают данные литературных источников. Так, в работе Balcan и соавторов показано, что лектин подснежника равномерно окрашивает тимоциты мыши, расположенные как в кортексе, так и в медулле [20]. Проведенные нами исследования также показывают, что с лектином подснежника связываются практически все клетки тимуса, имеющие лимфоидное происхождение, что позволяет использовать данный лектин для выделения лимфоцитов тимуса (см. табл. 3). При этом заслуживает внимания тот факт, что, согласно имеющимся в литературе данным, оба вышеуказанных лектина не окрашивают лимфоидные клетки тимуса куриных эмбрионов [21].

На основании приведенных результатов можно предполагать, что еще как минимум два исследуемых лектина могут быть пригодны для типирования различных популяций тимоцитов. При этом если лектин арахиса окрашивает все субпопуляции CD45<sup>+</sup>-клеток, то для лектина виноградной улитки подтверждаются литературные данные о преимущественном связывании с тимоцитами на ранних стадиях созревания, имея

в виду суммарную популяцию DN и DP (см. табл. 3 и [22]).

Впервые получен результат, согласно которому для идентификации DP-клеток может применяться  $\alpha$ DMan/ $\alpha$ DGlc-специфичный лектин белоцветника весеннего (LVA). С учетом очень большого числа MкАг против антигенов CD4 и CD8 человека и мыши на рынке, после проведения дополнительных исследований данный лектин потенциально может найти свое применение при изучении структуры популяций тимоцитов рыб, земноводных, рептилий, а также сельскохозяйственных животных в отсутствие доступных коммерческих моноклональных антител.

Еще одной интересной находкой представляется получение свидетельств наличия более плотных и разнообразных структур гликокаликса на созревающих клетках и уменьшение его углеводного разнообразия (но не плотности гликокаликса и заряда на нем) при переходе к зрелым SP-timoцитам (см. табл. 3). Методом проточной цитометрии с использованием панели лектинов этот факт показан впервые. Не исключено, что это справедливо и для нелимфоидных клеток стромы тимуса (см. табл. 2). Здесь речь может идти об общем случае, справедливом для различных клеток тканей внутренней среды. Изменения состава гликокаликса обычно сопровождают все процессы созревания и дифференцировки, активации и гибели клетки в норме и при патологии и могут выявляться при помощи лектинов разной

углеводной специфичности. Гликокаликс тимоцитов играет важную роль в процессах их распознавания стромальными клетками и в первую очередь, макрофагами, ответственными за элиминацию погибающих в ходе селекции клеток. Литература дает основания предполагать справедливость такого обобщения [11, 23, 24].

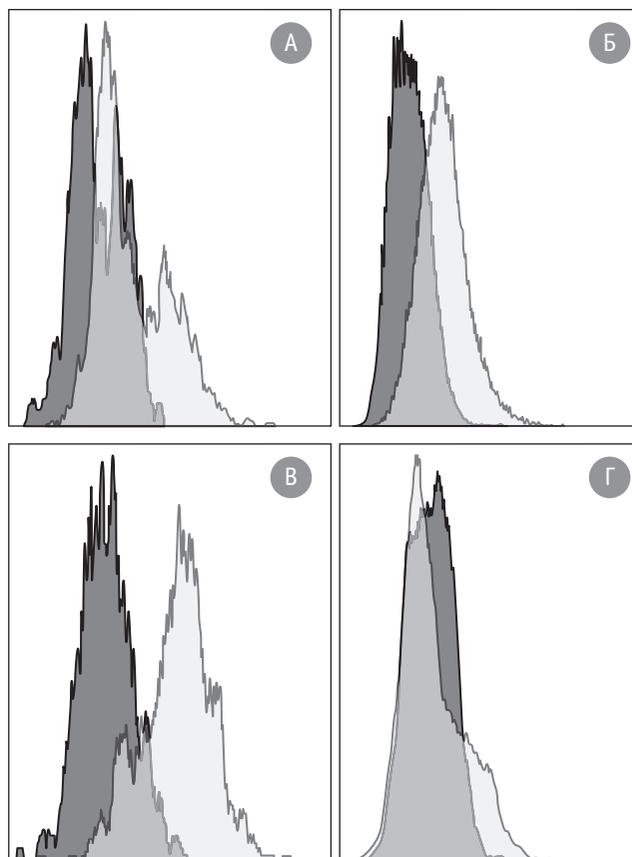
При аутоиммунных заболеваниях увеличивается количество эффекторных Т-клеток, несущих на своей поверхности терминальные NAcGal и Gal $\beta$ (1-4)NAcGlc [25–27]. Например, GalNAc-T1-трансфераза, используемая в качестве акцепторного субстрата негликозилированные пептиды, наиболее активна в незрелых тимоцитах кортекса, а в медуллярных тимоцитах также появляется GalNAc-T2-трансфераза, способная продуцировать *de novo* дисахаридные O-гликопептиды [28, 29].

Важным семейством углеводов, вовлеченных в процесс созревания тимоцитов, являются сиаловые кислоты (NeuNAc). Чаще всего производные нейраминной кислоты располагаются в терминальных положениях и, благодаря отрицательному заряду, оказываются задействованными в процессах распознавания, миграции и других межклеточных взаимодействиях. Кроме того, сиаловые кислоты маскируют гликаны, лежащие в гликокаликсе ниже, и таким образом блокируют связывание с ними эндогенных лектинов, выполняя важную регуляторную функцию [30].

Сиалотрансфераза ST3Gal I вовлечена в процесс созревания тимоцитов, поскольку является одним из факторов выживания Т-клеток. Отсутствие ее экспрессии приводит к повышению уровня апоптоза и заметному снижению количества CD8<sup>+</sup>-Т-клеток на периферии [31]. С ее помощью осуществляется сиалирование O-гликанов на маркерах дифференцировки Т-клеток CD45 и CD8, а ее отсутствие может влиять на способность корецептора CD8 связываться с комплексом антиген/МНС на поверхности антиген-презентирующей клетки [32]. Другая сиалотрансфераза тимоцитов – C2GnT – экспрессируется на стадиях DN и DP. В клетках субкапсулярной зоны ее активность подавляется ST3Gal I [33].

## Заключение

Использование проточной цитометрии лишь частично подтвердило возможность применения меченых лектинов для типирования тимоцитов мыши. Ни один из лектинов не обеспечивал избирательного окрашивания клеток стромы тимуса, при этом результаты окрашивания лектином подснежника (GNA) и лектином амариллиса (HNA) практически точно соответствовали результатам применения MkAt к антигену CD45. Также ни один из лектинов не обеспечивал избирательного связывания с клетками на любом из этапов дифференцировки тимоцитов (DN, DP, CD4<sup>+</sup>-SP, CD8<sup>+</sup>-SP). Лишь один лектин белочетника (LVA) преимущественно связывался с популяцией DP-timoцитов, хотя связывание было очень слабым и затрагивало не



**Рис. 3.** Связывание лектина зародышей пшеницы (WGA) с разными популяциями тимоцитов мыши

По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции WGA, конъюгированного с ФИТС, усл. ед., по оси ординат – количество клеток. А – CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-timoциты, Б – CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-timoциты, В – CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-timoциты, Г – CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-timoциты. Светлый пик – клетки, окрашенные WGA, темный пик – биологический контроль (см. подпись к рис. 2).

более 1% от всей субпопуляции DP. Частично подтвердились литературные данные о возможности использования лектинов арахиса (PNA) и виноградной улитки (HRA) для типирования тимоцитов: лектин арахиса связывает все DN-клетки, а лектин виноградной улитки преимущественно взаимодействует с незрелыми (DN и DP) тимоцитами. По-видимому, применение лектинов для типирования тимоцитов ограничивается областью сравнительной иммунологии и ветеринарии в случае отсутствия соответствующих моноклональных антител.

**Вклад авторов.** Сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста – Серебрякова М.К. Концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка данных – Кудрявцев И.В. Концепция и дизайн исследования, редактирование и утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – Полевщиков А.В.

## ■ Литература

- Sharon N., Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004; 14 (11): 53R–62R. doi: 10.1093/glycob/cwh122.
- Comelli E.M., Sutton-Smith M., Yan Q., Amado M., Panico M., Gilmartin T. et al. Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J. Immunol*. 2006; 177 (4): 2431–40. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2431.
- Daniels M.A., Hogquist K.A., Jameson S.C. Sweet'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat. Immunol*. 2002; 3 (10): 903–10. doi: 10.1038/ni1002-903.
- Morgan R., Morgan R., Gao G., Pawling J., Dennis J.W., Deme-triou M. et al. N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. *J. Immunol*. 2004; 173 (12): 7200–8. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7200.
- Bromley Sh.K., Burack W.R., Johnson K.G., Somersalo K., Sims T.N., Sumen C. et al. The immunological synapse. *Ann. Rev. Immunol*. 2001; 19 (1): 375–96. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.375.
- Wormald M.R., Stanfield R.L., Huang M., Mattsson N., Speir J.A., DiGennaro J.A. et al. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J. Mol. Biol*. 1999; 293 (2): 351–66. doi: 10.1006/jmbi.1999.3104.
- Ohtsubo K., Marth J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*. 2006; 126 (5): 855–67. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.019.
- Степаненко Р.Н., Львов В.Л., Андреев И.В., Новикова Е.М., Козырева О.В., Разваляева Н.А. и др. В(1-6)-D-глюкан из плодового тела гриба *Leninus edodes*: структура и иммунобиологические свойства. *Иммунология*. 2019; 40 (4): 13–22.
- Reisner Y., Sharon N. Cell fractionation by lectins. *Trends Biochem. Sci*. 1980; 5 (2): 29–31. doi: 10.1016/s0968-0004(80)80090-9.
- Reisner Y., Linker-Israeli M., Sharon N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell. Immunol*. 1976; 25 (1): 129–34. doi: 10.1016/0008-8749(76)90103-9.
- Raedler A., Raedler E., Becker W.M., Arndt R., Thiele H.G. Subcapsular thymic lymphoblasts expose receptors for soy bean lectin. *Immunology*. 1982; 46 (2): 321–8.
- Nakano T., Oguchi Y., Imai Y., Osawa T. Induction and separation of mouse helper T cells by lectins. *Immunology*. 1980; 40 (2): 217–22.
- Alvarez G., Lascurain R., Pérez A., Degand P., Montaña L.F., Martínez-Cairo S. et al. Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. *Immunol. Invest*. 1999; 28 (1): 9–18. doi: 10.3109/08820139909022719.
- Balcan E., Gümüş A., Şahin M. The glycosylation status of murine postnatal thymus: a study by histochemistry and lectin blotting. *J. Mol. Histol*. 2008; 39 (4): 417–26. doi: 10.1007/s10735-008-9180-3.
- Fernandez J.G., Sanchez A.J., Melcon C., Chamorro C.A., Garcia C., Paz P. Development of the chick thymus microenvironment: a study by lectin histochemistry. *J. Anat*. 1994; 184 (Pt 1): 137–45.
- Gheri G., Gheri Bryk S., Riccardi R., Sgambati E., Cirri Borghi M.B. The glycoconjugate sugar residues of the sessile and motile cells in the thymus of normal and Cyclosporin-A-treated rats: lectin histochemistry. *Histol. Histopathol*. 2002; 17 (1): 9–19. doi: 10.14670/HH-17.9.
- Paessens L.C., García-Vallejo J.J., Fernandes R.J., van Kooyk Y. The glycosylation of thymic microenvironments: a microscopic study using plant lectins. *Immunol. Lett*. 2007; 110 (1): 65–73. doi: 10.1016/j.imlet.2007.03.005.
- Киселевский М. В., Власенко Р.Я., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Прогностическая значимость опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. *Иммунология*. 2019; 40 (1): 73–82. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11009.
- Friemel H. (ed.). *Immunologische Arbeitsmethoden*. Jena : Gustav Fischer Verlag, 1984.
- Balcan E., Tuğlu I., Şahin M., Toparlak P. Cell surface glycosylation diversity of embryonic thymic tissues. *Acta Histochem*. 2008; 110 (1): 14–25. doi: 10.1016/j.acthis.2007.07.003.
- Jöns J., Mangold U., Neumann U., Van Damme E.J., Peumans W.J., Pfüller U. et al. Lectin histochemistry of the lymphoid organs of the chicken. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 2003; 207 (1): 85–94. doi: 10.1007/s00429-003-0331-8.
- Hellström U., Hammarström S., Dillner M.L., Perlmann H., Perlmann P. Fractionation of human blood lymphocytes on Helix pomatia A haemagglutinin coupled to sepharose beads. *Scand. J. Immunol*. 1976; 5 (suppl 5): 45–55. doi: 10.1111/j.1365-3083.1976.tb03855.x.
- Bilyy R.O., Antonyuk V.O., Stoika R.S. Cytochemical study of role of  $\alpha$ -D-mannose- and  $\beta$ -D-galactose-containing glycoproteins in apoptosis. *J. Mol. Histol*. 2004; 35 (8–9): 829–38. doi: 10.1007/s10735-004-1674-z.
- London J., Berrih S., Bach J. F. Peanut agglutinin I. A new tool for studying T lymphocyte subpopulations. *J. Immunol*. 1978; 121 (2): 438–43.
- Buzás E.I., György B., Pásztoi M., Jelinek I., Falus A., Gabius H.J. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. *Autoimmunity*. 2006; 39 (8): 691–704. doi: 10.1080/08916930601061470.
- Dube D.H., Bertozzi C.R. Glycans in cancer and inflammation – potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2005; 4 (6): 477–88. doi: 10.1038/nrd1751.
- Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc. Natl Acad. Sci*. 2002; 99 (16): 10231–3. doi: 10.1073/pnas.172380699.
- Alvarez G., Lascurain R., Hernández-Cruz P., Tetaert D., Degand P., Gorocica P. et al. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006; 1760 (8): 1235–40. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.024.
- Сенников С. В., Хантакова Ю.Н. Роль субпопуляций Т-клеток в индукции иммунологической толерантности. *Иммунология*. 2017; 38 (4): 239–44. doi: 10.18821/0206-4952-2017-38-4-239-244.
- Moody A.M., Chui D., Reche P.A., Priatel J.J., Marth J.D., Reinherz E.L. Developmentally regulated glycosylation of the CD8 $\alpha\beta$  coreceptor stalk modulates ligand binding. *Cell*. 2001; 107 (4): 501–12. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00577-3.
- Priatel J.J., Chui D., Hiraoka N., Simmons C.J., Richardson K.B., Page D.M. et al. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity*. 2000; 12 (3): 273–83. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80180-6.
- Wu W., Harley P.H., Punt J.A., Sharrow S.O., Kears K.P. Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes. *J. Exp. Med*. 1996; 184 (2): 759–64. doi: 10.1084/jem.184.2.759.
- Baum L.G., Derbin K., Perillo N.L., Wu T., Pang M., Uittenbogaart C. Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. *J. Biol. Chem*. 1996; 271 (18): 10793–9. doi: 10.1074/jbc.271.18.10793.

## ■ References

- Sharon N., Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004; 14 (11): 53R–62R. doi: 10.1093/glycob/cwh122.
- Comelli E.M., Sutton-Smith M., Yan Q., Amado M., Panico M., Gilmartin T., et al. Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J. Immunol*. 2006; 177 (4): 2431–40. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2431.
- Daniels M.A., Hogquist K.A., Jameson S.C. Sweet'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat. Immunol*. 2002; 3 (10): 903–10. doi: 10.1038/ni1002-903.
- Morgan R., Morgan R., Gao G., Pawling J., Dennis J.W., Deme-triou M., et al. N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. *J. Immunol*. 2004; 173 (12): 7200–8. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7200.
- Bromley Sh.K., Burack W.R., Johnson K.G., Somersalo K., Sims T.N., Sumen C., et al. The immunological synapse. *Ann. Rev. Immunol*. 2001; 19 (1): 375–96. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.375.
- Wormald M.R., Stanfield R.L., Huang M., Mattsson N., Speir J.A., DiGennaro J.A., et al. Roles for glycosylation of cell surface receptors

involved in cellular immune recognition. *J. Mol. Biol.* 1999; 293 (2): 351–66. doi: 10.1006/jmbi.1999.3104.

7. Ohtsubo K., Marth J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell.* 2006; 126 (5): 855–67. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.019.

8. Stepanenko R.N., L'vov V.L., Andreev I.V., Novikova E.M., Kozyreva O.V., Razvalyaeva N.A., et al. B(1-6)-D-glucan from the fruit body of mushroom *Lentinus edodes*: structure and immunobiological properties. *Immunologiya.* 2019; 40 (4): 13–22. (in Russian)

9. Reisner Y., Sharon N. Cell fractionation by lectins. *Trends Biochem. Sci.* 1980; 5 (2): 29–31. doi: 10.1016/s0968-0004(80)80090-9.

10. Reisner Y., Linker-Israeli M., Sharon N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell. Immunol.* 1976; 25 (1): 129–34. doi: 10.1016/0008-8749(76)90103-9.

11. Raedler A., Raedler E., Becker W.M., Arndt R., Thiele H.G. Subcapsular thymic lymphoblasts expose receptors for soy bean lectin. *Immunology.* 1982; 46 (2): 321–8.

12. Nakano T., Oguchi Y., Imai Y., Osawa T. Induction and separation of mouse helper T cells by lectins. *Immunology.* 1980; 40 (2): 217–22.

13. Alvarez G., Lascurain R., Pérez A., Degand P., Montaña L.F., Martínez-Cairo S., et al. Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. *Immunol. Invest.* 1999; 28 (1): 9–18. doi: 10.3109/08820139909022719.

14. Balcan E., Gümüş A., Şahin M. The glycosylation status of murine postnatal thymus: a study by histochemistry and lectin blotting. *J. Mol. Histol.* 2008; 39 (4): 417–26. doi: 10.1007/s10735-008-9180-3.

15. Fernandez J.G., Sanchez A.J., Melcon C., Chamorro C.A., Garcia C., Paz P. Development of the chick thymus microenvironment: a study by lectin histochemistry. *J. Anat.* 1994; 184 (Pt 1): 137–45.

16. Gheri G., Gheri Bryk S., Riccardi R., Sgambati E., Cirri Borghi M.B. The glycoconjugate sugar residues of the sessile and motile cells in the thymus of normal and Cyclosporin-A-treated rats: lectin histochemistry. *Histol. Histopathol.* 2002; 17 (1): 9–19. doi: 10.14670/HH-17-9.

17. Paessens L.C., Garcia-Vallejo J.J., Fernandes R.J., van Kooyk Y. The glycosylation of thymic microenvironments: a microscopic study using plant lectins. *Immunol. Lett.* 2007; 110 (1): 65–73. doi: 10.1016/j.imlet.2007.03.005.

18. Kiselevskiy M.V., Vlasenko R.Ya., Zabolotina T.N., Kadagidze Z.G. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunologiya.* 2019; 40 (1): 73–82. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11009. (in Russian)

19. Friemel H. (ed.). *Immunologische Arbeitsmethoden.* Jena: Gustav Fischer Verlag, 1984.

20. Balcan E., Tuğlu I., Şahin M., Toparlak P. Cell surface glycosylation diversity of embryonic thymic tissues. *Acta Histochem.* 2008; 110 (1): 14–25. doi: 10.1016/j.acthis.2007.07.003.

21. Jörns J., Mangold U., Neumann U., Van Damme E.J., Peumans W.J., Pfüller U., et al. Lectin histochemistry of the lymphoid organs of the chicken. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 2003; 207 (1): 85–94. doi: 10.1007/s00429-003-0331-8.

22. Hellström U., Hammarström S., Dillner M.L., Perlmann H., Perlmann P. Fractionation of human blood lymphocytes on Helix pomatia A haemagglutinin coupled to sepharose beads. *Scand. J. Immunol.* 1976; 5 (suppl 5): 45–55. doi: 10.1111/j.1365-3083.1976.tb03855.x.

23. Bilyy R.O., Antonyuk V.O., Stoika R.S. Cytochemical study of role of  $\alpha$ -d-mannose- and  $\beta$ -d-galactose-containing glycoproteins in apoptosis. *J. Mol. Histol.* 2004; 35 (8–9): 829–38. doi: 10.1007/s10735-004-1674-z.

24. London J., Berris S., Bach J. F. Peanut agglutinin I. A new tool for studying T lymphocyte subpopulations. *J. Immunol.* 1978; 121 (2): 438–43.

25. Buzás E.I., György B., Pásztoi M., Jelinek I., Falus A., Gabius H.J. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. *Autoimmunity.* 2006; 39 (8): 691–704. doi: 10.1080/08916930601061470.

26. Dube D.H., Bertozzi C.R. Glycans in cancer and inflammation – potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005; 4 (6): 477–88. doi: 10.1038/nrd1751.

27. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2002; 99 (16): 10231–3. doi: 10.1073/pnas.172380699.

28. Alvarez G., Lascurain R., Hernández-Cruz P., Tetaert D., Degand P., Gorocica P., et al. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1760 (8): 1235–40. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.024.

29. Sennikov S. V., Khantakova J.N. Role of T-cell subpopulations in the immunologic tolerance induction. *Immunologiya.* 2017; 38 (4): 239–44. doi: 10.18821/0206-4952-2017-38-4-239-244. (in Russian)

30. Moody A.M., Chui D., Reche P.A., Priatel J.J., Marth J.D., Reinherz E.L. Developmentally regulated glycosylation of the CD8 $\alpha\beta$  coreceptor stalk modulates ligand binding. *Cell.* 2001; 107 (4): 501–12. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00577-3.

31. Priatel J.J., Chui D., Hiraoka N., Simmons C.J., Richardson K.B., Page D.M., et al. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity.* 2000; 12 (3): 273–83. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80180-6.

32. Wu W., Harley P.H., Punt J.A., Sharrow S.O., Kearse K.P. Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes. *J. Exp. Med.* 1996; 184 (2): 759–64. doi: 10.1084/jem.184.2.759.

33. Baum L.G., Derbin K., Perillo N.L., Wu T., Pang M., Uittenbogaart C. Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (18): 10793–9. doi: 10.1074/jbc.271.18.10793.

© Коллектив авторов, 2019

Николаева И.А.<sup>1</sup>, Кулага О.С.<sup>1</sup>, Авоян Г.Э.<sup>1</sup>, Смирнов В.В.<sup>1,2</sup>,  
Топтыгин А.Ю.<sup>1</sup>, Павленко М.К.<sup>2</sup>, Гороховец Н.В.<sup>2</sup>, Андреев И.В.<sup>1</sup>,  
Селезнев А.С.<sup>2</sup>, Мартынов А.И.<sup>1</sup>

## Изучение аллергенов березы бородавчатой, выделенных из пыльцы, собранной в период с 2008 по 2015 г.

<sup>1</sup> ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, 115522, г. Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)», 119991, г. Москва, Россия

### Резюме

**Введение.** Аллергия к пыльце березы относится к числу наиболее распространенных в России пыльцевых аллергий. Для ее этиологического лечения применяют аллерген-специфическую иммунотерапию (АСИТ). Для проведения АСИТ используют аллергены, полученные из натурального сырья, что может привести к различиям между сериями препарата. Выполнение требований надлежащей производственной практики (GMP) на всех стадиях производства, начиная от получения сырья и заканчивая контролем качества готового продукта, позволит обеспечить стандартный состав и иммунологическую активность аллергенов (нативных экстрактов) от различных производителей и партий препаратов от одного производителя.

**Цель** – изучение с помощью современных физико-химических методов аллергенов березы бородавчатой (лат. *Bétula péndula*), выделенных из пыльцы, собранной в период с 2008 по 2015 г.

**Материал и методы.** Аллергены выделяли из пыльцы путем обезжиривания и водно-солевой экстракции. Белковый состав аллергенов анализировали с помощью гель-фильтрации и электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), специфическую активность определяли с помощью твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА).

**Результаты.** На примере аллергенов пыльцы березы бородавчатой представлена технология получения и результаты контроля качества пыльцевых аллергенов. Профили гель-фильтрации экстрактов пыльцы, собранной в разные годы, различаются, тогда как профили электрофореза в ПААГ сходны. Препараты аллергенов проявляют сходную способность связываться с IgE-антителами сыворотки крови пациентов с аллергией, т. е. специфическую активность. Сходство профилей белкового электрофореза и сходная специфическая активность указывают на однородность препаратов и адекватность метода выделения.

**Заключение.** Исследование препаратов аллергенов с помощью комплекса современных методов (хроматография, электрофорез в ПААГ и конкурентный ИФА) обеспечивает стандартизацию согласно требованиям GMP. Использование конкурентного ИФА позволяет оценить способность препаратов аллергенов связываться с IgE, что позволяет рекомендовать этот метод для оценки аллергенности препарата в качестве информативного теста для подтверждения специфической активности препаратов наряду с кожными пробами. Можно ожидать, что дальнейшие исследования позволят исключить необходимость проведения испытаний каждой серии препарата в кожных пробах с привлечением пациентов-добровольцев. Использование современных методов контроля позволит обеспечить стандартность и стабильное высокое качество выпускаемых препаратов.

**Ключевые слова:** пыльцевые аллергены; экстракты аллергенов; береза; стандартизация; АСИТ; гель-хроматография; электрофорез в ПААГ; иммуноферментный анализ (ИФА)

Для корреспонденции  
Смирнов Валерий Валерьевич –  
кандидат фармацевтических наук,  
заведующий лабораторией  
клинической фармакологии  
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»  
ФМБА России,  
Москва, Россия  
E-mail: vall@mail.mipt.ru  
<http://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

Статья поступила 12.09.2019. Принята в печать 16.10.2019.

**Для цитирования:** Николаева И.А., Кулага О.С., Авоян Г.Э., Смирнов В.В., Топтыгин А.Ю., Павленко М.К., Гороховец Н.В., Андреев И.В., Селезнев А.С., Мартынов А.И. Изучение аллергенов березы бородавчатой, выделенных из пыльцы, собранной в период с 2008 по 2015 г. Иммунология. 2019; 40 (6): 50–56. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16007

**Финансирование.** Исследование проводили в рамках госзадания ФМБА по теме «Разработка технологий, создание и испытание противоаллергических лекарственных препаратов» (шифр: «Аллергобиотехнологии-16»).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Nikolaeva I.A.<sup>1</sup>, Kulaga O.S.<sup>1</sup>, Avoyan G.E.<sup>1</sup>, Smirnov V.V.<sup>1,2</sup>, Toptygin A.Yu.<sup>1</sup>, Pavlenko M.K.<sup>2</sup>, Gorokhovets N.V.<sup>2</sup>, Andreev I.V.<sup>1</sup>, Seleznev A.S.<sup>2</sup>, Martynov A.I.<sup>1</sup>**

## Studies of birch wart allergens obtained from pollen collected from 2008 to 2015 years

<sup>1</sup> National Research Center – Institute of immunology of Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russia

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russia

### Abstract

**Introduction.** Birch pollen allergy is one of the most frequent pollen allergies in Russia. In the case of allergy, preventive strategies include mainly allergen-specific forms of prevention, i.e., allergen avoidance and allergy vaccination, i.e., allergen-specific immunotherapy, AIT.

Since extracts of allergens are obtained from natural raw materials, their composition may be highly biologically variable. This variability causes differences between consignments of medicine. Quality of drugs directly depends on the quality of the raw materials, thus it must meet the highest standards. Compliance with the requirements of standardization ensures the same composition and immunological activity of allergens (native extracts), issued by different manufacturers as well as from different batches issued by the same manufacturer.

**Aim** – studies of birch wart allergens obtained from pollen collected from 2008 to 2015 years using the complex of contemporary methods.

**Material and methods.** Allergens were extracted from pollen via degreasing with ether followed by water-salt extraction. Allergen proteins were analyzed with gel filtration and PAAG electrophoresis. Specific activity was determined with solid-phase competitive enzyme immunoassay (ELISA).

**Results.** On the example of birch wart pollen we present production technology and the results of quality control for pollen allergens. Gel chromatography profiles of pollen extracts collected during different years are different, while PAAG electrophoresis profiles are identical. Allergens show similar ability to bind IgE antibodies from sera of allergic patients (i.e. specific activity). These results demonstrate homogeneity of preparations and compliance of extraction methods.

**Conclusion.** Studies of birch wart allergen with complex of methods (chromatography, PAAG electrophoresis and competitive ELISA) allows to standardize preparations according to GMP. Competitive ELISA allows evaluate the ability of allergens to bind with IgE. Therefore we recommend this method for the evaluation of allergenic properties of preparations. This test allows, along with skin tests, to prove specific activity of preparations. Further studies will allow to exclude skin tests for each batch of allergens with involvement of volunteers. The use of contemporary methods of control would enable to ensure standardization and stable high quality of production.

**Keywords:** pollen allergens; allergenic extracts; birch; standardization; AIT; gel-chromatography; SDS-PAGE; ELISA

**Received** 12.09.2019. **Accepted** 16.10.2019.

**For citation:** Nikolaeva I.A., Kulaga O.S., Avoyan G.E., Smirnov V.V., Toptygin A.Yu., Pavlenko M.K., Gorokhovets N.V., Andreev I.V., Seleznev A.S., Martynov A.I. Studies of birch wart allergens obtained from pollen collected from 2008 to 2015 years. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 50–6. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16007

**Funding.** The study was carried out within the framework of the FMBA state task on the topic «development of technologies, creation and testing of anti-allergic drugs» (code: «Аллергобиотехнологии-16»).

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

### For correspondence

Smirnov Valery V. –  
PhD, Head of Laboratory  
of Clinical Pharmacology,  
NRC Institute of Immunology  
FMBA of Russia,  
Moscow, Russia  
E-mail: vall@mail.mipt.ru  
<http://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

По данным эпидемиологических исследований, проведенных в различных странах, распространение аллергических заболеваний в течение последних десятилетий возросло в 3–4 раза и охватило от 10 до 30% населения Земли [1]. Ни в одной стране не отмечается ни снижения, ни стабилизации роста данной патологии. Так, в Центральной и Северной Европе пыльца березы как причина поллиноза составляет почти 20% всех случаев пыльцевой аллергии [1]. Приблизительно 70% пациентов с респираторной аллергией, обусловленной пылью березы, также страдают пищевой аллергией (в основном на фрукты семейства розоцветных, а также на фундук, сельдерей и морковь). Единственным доступным на сегодняшний момент этиологическим методом лечения является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ). Цель лечения – снижение чувствительности пациента к естественной экспозиции с данным аллергеном – специфическая гипосенсибилизация [1–3]. Для достижения цели необходимо введение соответствующих препаратов, в основном представляющих собой продукты экстракции из натуральных источников, в частности из пыльцы растений. Белковый состав пыльцы и, следовательно, количественное содержание аллергенов в исходном сырье может зависеть от различных факторов, таких, как погодные условия, географическое происхождение сырья и т.д. Выделение аллергенов методом экстракции не гарантирует одинаковое количественное содержание веществ в экстракте. В связи с этим необходима стандартизация состава аллергенов в полученных экстрактах для обеспечения надлежащего качества полученного продукта с целью повышения эффективности и безопасности АСИТ [4]. На сегодняшний день в стандартизации аллергенов существует несколько подходов: в США внедряется система национальных стандартных образцов, биологическая активность которых определена одной методикой, в Европе каждая фирма-производитель создает собственные внутренние стандарты (IHRS), охарактеризованные различными методами, но с обязательной оценкой мажорных аллергенов. Производимые в Российской Федерации препараты аллергенов стандартизуют по содержанию единиц белкового азота (protein nitrogen unit – PNU). В основе стандартизации по системе PNU лежит утверждение, что большинство аллергенов имеет белковую природу. Однако содержание белкового азота не отражает в полной мере биологическую активность

**Таблица 1.** Препараты аллергенов, полученных из пыльцы березы бородавчатой, собранной в разные годы

Год сбора сырья	Название препарата
2008	АНБ С-1-08
2010	АНБ С-2-10
2012	АНБ С-3-12
2013	АНБ С-4-13
2015	АНБ С-5-15

аллергенов, так как не все экстрагируемые белки обладают аллергенными свойствами. В системе стандартизации по PNU специфическую активность препаратов необходимо подтверждать кожными пробами [5, 6]. В связи с тем, что выпускаемые отечественными производителями лечебные и диагностические аллергены стандартизируются по содержанию единиц белкового азота, необходимо привести отечественные технологии получения и стандартизации аллергенных препаратов в соответствие с мировым уровнем. Это может быть достигнуто путем внедрения в стандартизацию и контроль качества современных физико-химических методов [7].

## Материал и методы

**Объект исследования:** пыльца березы бородавчатой (сбор в 2008, 2010, 2012, 2013 и 2015 гг.). Сбор пыльцы проводили в период цветения. Высушивали до остаточной влажности  $3 \pm 0,5\%$ . Пыльцу характеризовали по морфологическим признакам (диаметр пыльцевого зерна, структура экзимы, форма пыльцевого зерна). Допускается не более 10% примесей других видов пыльцы (определяется микроскопическим способом). Содержание тяжелых металлов в сульфатной золе из 1 г пыльцы (точная навеска) не более 0,001%. Зараженность растительной пыльцы амбарными вредителями не превышала I степени чистоты (что отвечает требованиям). Все показатели отвечали требованиям ГФ XIV.

Для обезжиривания пыльцы смешивали навеску сырья с диэтиловым эфиром в соотношении 1 : 4. После 2–3 ч настаивания раствор фильтровали через складчатый фильтр. Содержимое высушивали на фильтре. Препарат взвешивали и затем проводили водно-солевую экстракцию раствором бикарбоната аммония 4,0 г/л в соотношении обезжиренная пыльца – экстрагент 1 : 20. Раствор перемешивали на магнитной мешалке и оставляли в прохладном месте на 24 ч. Полученный экстракт центрифугировали, собирали надосадочную жидкость и последовательно фильтровали через фильтры с различным диаметром пор. Далее проводили диализ надосадочной жидкости против апирогенной воды на холоде в течение 24 ч. Диализат центрифугировали и выполняли стерилизующую фильтрацию. Полученные аллергены лиофильно высушивали и использовали в дальнейших исследованиях.

Хроматографический анализ аллергенов березы бородавчатой осуществляли с помощью хроматографической системы среднего давления FPLC Pharmacia Biotech (США). Использовали колонку Superdex 200 HR 10x30. Скорость потока 0,5 мл/мин; детектирование при 280 нм, объем образца 0,2 мл.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Лэмли [8]. Белок определяли по методу Лоури (метод А) [9].

Для определения специфических IgE-антител человека выполняли конкурентный иммуоферментный анализ (ИФА). Для выполнения ИФА использовали набор реагентов «АллергоИФА-специфические IgE» про-

изводства фирмы «Алкор-Био» (Россия), предназначенный для количественного определения специфических IgE в сыворотке крови человека. Конкурентный анализ проводили в авторской модификации, а именно вносили исследуемый аллерген в конкуренции с биотинилированным аллергеном. В используемых наборах на твердой фазе (планшетах для ИФА) сорбированы моноклональные антитела против IgE человека.

1. В каждую лунку вносили 50 мкл пулированной сыворотки пациентов, сенсibilизированных к исследуемому аллергену.

2. В каждую лунку добавляли 50 мкл исследуемого препарата испытуемого аллергена, разведенного на фосфатном солевом буфере (Sigma) в следующих количествах: 5,000; 2,500; 1,250 и 0,625 мкг/лунка и по 50 мкл коммерческого биотинилированного аллергена березы (из набора «АллергоИФА-специфические IgE» фирмы «АлкорБио»). В контрольную лунку вносили только 50 мкл биотинилированного аллергена и 50 мкл фосфатного солевого буфера.

3. Выдерживали при температуре  $37 \pm 3$  °C в течение одного часа на шейкере.

4. По окончании инкубации пятикратно промывали раствором для промывания.

5. В каждую лунку вносили по 150 мкл конъюгата (стрептавидин-пероксидаза).

6. Выдерживали при температуре  $37 \pm 3$  °C в течение одного часа на шейкере.

7. По окончании инкубации пятикратно промывали раствором для промывания.

8. В каждую лунку вносили по 100 мкл раствора субстрата пероксидазы (тетраметилбензидина) и выдерживали 15 мин на шейкере при  $37 \pm 3$  °C.

9. Через 15 мин реакцию останавливали стоп-реагентом (серной кислотой).

10. Оптическую плотность продуктов ферментативной реакции определяли при длине волны 450 нм с помощью многоканального спектрофотометра Multiscan.

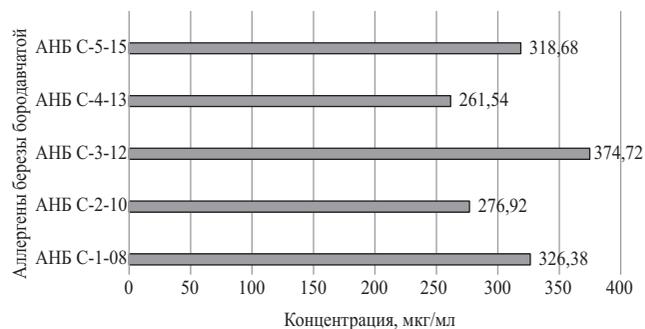
## Результаты и обсуждение

С помощью экстракции из образцов пыльцы, собранной в 2008, 2010, 2012, 2013 и 2015 гг., были получены следующие препараты аллергенов (табл. 1).

Из лиофильно высушенных аллергенов (см. раздел «Материал и методы») брали навеску и готовили растворы с концентрацией по массе 1 мг/мл.

В аллергенах количественно определяли белок в соответствии с ГФ XIV по методу Лоури [9] и анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в диссоциирующих условиях по Лэмбли [8]. Результаты определения концентрации общего белка в образцах аллергенов по Лоури представлены на рис. 1.

Как видно из гистограммы (см. рис. 1), различия концентрации белка в образцах, полученных одним и тем же методом из экстрагированного сырья, статистически недостоверны, и с точки зрения стандартизации их можно считать одинаковыми.



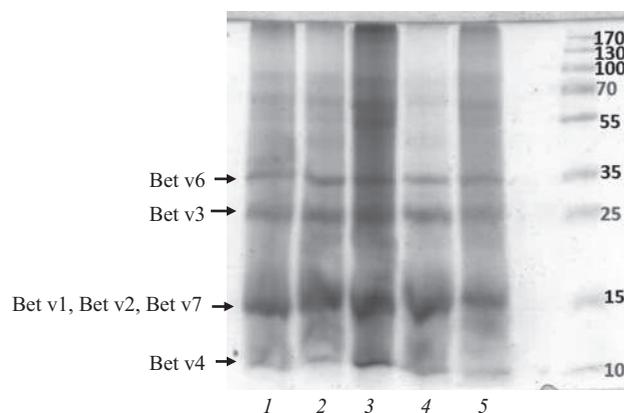
**Рис. 1.** Определение концентрации общего белка в образцах аллергенов березы бородавчатой методом Лоури без осаждения [9]

По оси абсцисс – концентрация белка в мкг/мл; по оси ординат – номер серии аллергена.

Белковые профили серий аллергенов исследовали с помощью электрофореза по Лэмбли в 12% полиакриламидном геле в диссоциирующих условиях [8]. Результаты электрофореза представлены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, белковый профиль всех пяти образцов аллергенов из пыльцы березы одинаков. Во всех образцах присутствуют полосы, соответствующие по молекулярной массе мажорным антигенам Bet v4, Bet v1, Bet v2, Bet v7, Bet v3, Bet v6.

При гель-хроматографии было установлено, что белковые профили аллергенов березы бородавчатой из пыльцы, собранной в разные годы, значительно различаются: при гель-хроматографии в мягких условиях в аллергенах обнаруживается целый ряд пиков высоко- и низкомолекулярных соединений, высота и положение которых для различных образцов различается (рис. 3).



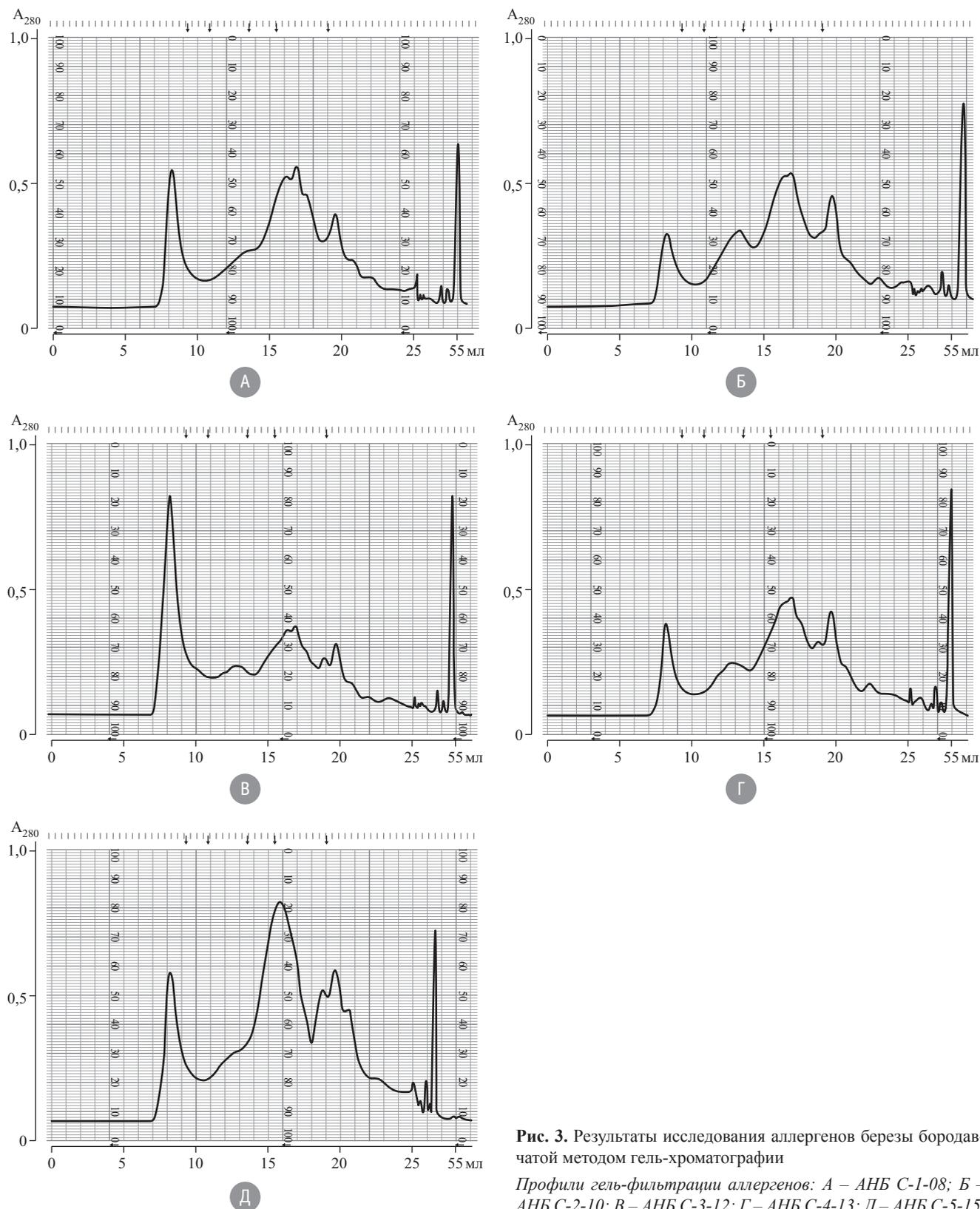
**Рис. 2.** Исследование аллергенов, выделенных из пыльцы березы бородавчатой, собранной в разные годы, с помощью электрофореза в диссоциирующих условиях

1 – АНБ-С-1-08; 2 – АНБ-С-2-10; 3 – АНБ-С-3-12; 4 – АНБ-С-4-13; 5 – АНБ-С-5-15. Справа – маркеры молекулярной массы. Антигены Bet v1, Bet v2, Bet v7 слабо разрешаются электрофорезом и видны как одна широкая полоса.

Возможно, различия белковых профилей связаны с погодными условиями и условиями сбора пыльцы.

Для нашего исследования наиболее важно было определить, влияют ли эти различия на аллергенность препарата.

Специфические аллергенные компоненты в образцах выявляли с помощью конкурентного ИФА с использованием полученной авторами пулированной специфической IgE-содержащей сыворотки крови пациентов, сенсibilизированных к исследуемому аллер-



**Таблица 2.** Связывание препаратов аллергенов, выделенных из пыльцы березы бородавчатой, с IgE в зависимости от концентрации аллергена

Исследуемый препарат	ОП <sub>450</sub> /% ингибирования				
	Количество аллергена, мкг/лунка				
	5,000	2,500	1,250	0,625	0,000
АНБ С-1-08	0,098/94,3	0,156/88,3	0,227/80,8	0,355/66,9	1,081
АНБ С-2-10	0,061/98,2	0,073/97,0	0,100/94,0	0,139/90,0	1,081
АНБ С-3-12	0,06/98,3	0,072/96,9	0,099/94,1	0,137/90,2	1,081
АНБ С-4-13	0,059/98,5	0,072/97,4	0,089/95,2	0,130/90,9	1,081
АНБ С-5-15	0,061/98,2	0,073/96,8	0,093/94,8	0,139/90,0	1,081

гену. Результаты типичного эксперимента представлены в табл. 2.

В табл. 2 приведены значения оптической плотности колориметрической реакции при 450 нм в конкурентном ИФА (ОП<sub>450</sub>) (в числителе) и % ингибирования (в знаменателе). Для конкуренции с исследуемыми аллергенами использовали стандартный препарат биотинилированного аллергена березы бородавчатой, прилагаемый к набору «Алкор-Био» (Россия). В контрольную лунку (без испытуемого аллергена) вносили только препарат биотинилированного аллергена.

Как видно из табл. 2, все исследуемые препараты аллергенов, выделенных из пыльцы березы бородавчатой, собранной в разные годы, проявляют сходную способность связываться с антителами класса IgE, т. е. аналогичную способность ингибировать связывание биотинилированного аллергена в зависимости от концентрации. Эти результаты свидетельствуют об однородности препаратов и адекватности метода выделения.

Таким образом, использование конкурентного ИФА дает возможность оценить способность препаратов аллергена связываться с IgE, что позволяет рекомендовать описанный метод для оценки аллергенности препарата в качестве информативного теста, подтверждающего специфическую активность препаратов наряду с кожными пробами [5, 6].

## Заключение

При получении препаратов аллергенов необходима стандартизация на каждом этапе производства, начиная со сбора пыльцы. Различные условия сбора пыльцы могут сказаться на составе конечного продукта. Очевидно, что вследствие сложного состава получаемых экстрактов пыльцы для подтверждения качественного и количественного состава препаратов аллергенов необходимо совместно использовать несколько инструментальных методов анализа.

В настоящей работе сравнивали результаты различных методов исследования препаратов аллергенов, полученных из пыльцы березы бородавчатой, собранной в разные годы, а именно гель-фильтрации, электрофореза в ПААГ в диссоциирующих условиях и иммуноферментного анализа. Показано, хотя профили гель-фильтрации экстрактов пыльцы различаются, профили электрофореза образцов сходны.

Вероятно, наблюдаемое несходство результатов исследования аллергенов связано с различными методами подготовки образцов к анализу и отличием условий проведения самого анализа.

Подготовка образцов к гель-фильтрации и сама гель-фильтрация проводятся в мягких условиях, и профили гель-фильтрации отражают простую агрегацию молекул. Напротив, при электрофорезе по Лэмбли в жестких условиях подготовки проб (применение додецилсульфата натрия) агрегация отсутствует, вторичная и третичная структура нативных белков нарушается, и профиль отражает разделение индивидуальных молекул белка по молекулярной массе и заряду.

Таким образом, профили гель-фильтрации не отражают качественного и количественного состава белков аллергенов. Природу различных профилей гель-фильтрации еще предстоит выяснить, можно предполагать, что эта несхожесть отражает несовпадение по качеству (размеру) и количеству агрегатов белковых молекул, сохраняющиеся в мягких условиях гель-фильтрации.

Показано, что исследуемые препараты аллергенов, выделенных из пыльцы березы бородавчатой, собранной в различные годы, проявляют сходную способность связываться с антителами класса IgE, что указывает на однородность препаратов и адекватность метода выделения.

Применение метода Лоури для определения концентрации белка и электрофореза в ПААГ для оценки белкового профиля аллергенов необходимы для стандартизации и обеспечения стабильного качества выпускаемых препаратов аллергенов. Стандартность аллергенов – сырья для получения алергоидов, в свою очередь, обеспечит лучшие условия и результаты проведения АСИТ.

Конкурентный ИФА дает возможность оценить способность препаратов аллергена связываться с IgE, что позволяет рекомендовать описанный метод для оценки аллергенности препарата в качестве информативного теста для подтверждения специфической активности препаратов наряду с кожными пробами. Можно ожидать, что дальнейшие исследования позволят исключить необходимость испытаний каждой серии препарата в кожных пробах с привлечением пациентов-добровольцев.

Таким образом, использование современных методов контроля обеспечит стандартизацию и стабильное качество выпускаемых препаратов.

## ■ Литература

1. Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Медунцын Н.В. Механизмы аллергической реакции немедленного типа, препараты и методы специфической иммунотерапии. *Иммунология*. 2016; 37 (1): 51–60.
2. Коваленко Н.В., Кутузова Е.А., Богаченко С.М. Безопасность и эффективность аллерген-специфической иммунотерапии в лечении поллинозов. *Главный врач Юга России*. 2018; 3 (62): 22–4.
3. Сновская М.А., Намазова-Баранова Л.С., Семикина Е.Л. и др. Особенности диагностического обследования пациентов с поливалентной сенсибилизацией перед проведением аллерген-специфической иммунотерапии и оценка ее результатов лабораторными методами. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2014; 7–8: 85–92.
4. Jutel M. Allergen-specific immunotherapy in Asthma. *Curr Treat Options Allergy*. 2014; 1 (2): 213–9.

5. Общая фармакопейная статья 1.7.1.0001.15. Аллергены. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1, М.; 2018.
6. Невская Л.В., Лавренчик Е.И., Жданова М.Ю. и др. Международный опыт стандартизации препаратов аллергенов. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017; 17 (4): 222–9.
7. Игнатов А.А., Раменская Г.В., Смирнов В.В. Современные тенденции в стандартизации препаратов аллергенов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2015; 1: 16–20.
8. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981.
9. Общая фармакопейная статья 1.2.3.0012.15. Определение белка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1, М.; 2018.

## ■ References

1. Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Medunitsyn N.V. Mechanisms of allergic reactions of immediate type, drugs and methods of immunotherapy. *Immunologiya*. 2016; 37 (1): 51–60. (in Russian)
2. Kovalenko N.V., Kutuzova E.A., Bogachenko S.M. Safety and efficacy of allergen-specific immunotherapy in the treatment of pollinosis. *Chief Doctor of the South of Russia*. 2018; 3 (62): 22–4. (in Russian)
3. Snovskaya M.A., Namazova-Baranova L.S., Semikina E.L., et al. Features of diagnostic examination of patients with polyvalent sensitization before conducting allergen-specific immunotherapy and evaluation of its results using laboratory methods. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2014; 7–8: 85–92. (in Russian)
4. Jutel M. Allergen-specific immunotherapy in Asthma. *Curr Treat Options Allergy*. 2014; 1 (2): 213–9.

5. General pharmacopoeial article 1.7.1.0001.15. Allergens. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. XIV ed. Vol. 1. Moscow; 2018.
6. Nevskaya L.V., Lavrenchik E.I., Zhdanova M.Yu., et al. International experience in the standardization of allergen preparations. *Biopreparations. Prevention, diagnosis, treatment*. 2017; 17 (4): 222–9. (in Russian)
7. Ignatov A.A., Ramenskaya G.V., Smirnov V.V. Current trends in the standardization of drugs allergens. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2015; 1: 16–20. (in Russian)
8. Osterman L.A. *Methods of research of proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifugation (practical guide)*. M.: Science (Nauka), 1981. (in Russian)
9. General pharmacopoeial article 1.2.3.0012.15. Determination of protein. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. XIII ed. Vol. 1. Moscow; 2015.

## Обзоры

© Коллектив авторов, 2019

Пинегин Б.В., Хайтов Р.М.

## Современные принципы создания иммуностропных лекарственных препаратов

National Research Center – Institute of immunology of Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russia

### Резюме

В настоящее время показано, что включение иммуностимуляторов в комплексную терапию заболеваний, связанных с нарушением иммунной системы, позволяет в ряде случаев существенно повысить эффективность этиотропной терапии и быстрее достичь клинического эффекта. Эти данные стали основой для создания ряда лекарственных препаратов, направленных на усиление функциональной активности клеток иммунной системы. В то же время возникла необходимость стандартизации и разработки определенных требований к лекарственным препаратам, относящимся к иммуностимуляторам, чему и посвящен настоящий обзор.

**Ключевые слова:** иммунофармакология; этиотропная терапия; иммуностимуляторы; патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; врожденный иммунитет; обзор

Статья поступила 02.08.2019. Принята в печать 16.10.2019.

**Для цитирования:** Пинегин Б.В., Хайтов Р.М. Современные принципы создания иммуностропных лекарственных препаратов. Иммунология. 2019; 40 (6): 57–62. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16008

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Pinegin B.V., Khaitov R.M.

## Modern principles of immunotropic drugs creation

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

### Abstract

It has now been shown that the inclusion of immunostimulators in the complex therapy of diseases associated with impaired immune system, can significantly increase in some cases the effectiveness of etiotropic therapy and reach the clinical effect quicker. These data were the basis for the creation of a number of therapeutic drugs aimed at activating the functional activity of the cells of the immune system. At the same time, as a result of these data, it became necessary to standardize and develop certain requirements for therapeutic drugs, defined as immunostimulators, which this review is devoted to.

**Keywords:** immunopharmacology; etiotropic therapy; immunostimulators; pathogen-associated molecular patterns; innate immunity; review

Received 02.08.2019. Accepted 16.10.2019.

**For citation:** Pinegin B.V., Khaitov R.M. Modern principles of immunotropic drugs creation. Immunologiya. 2019; 40 (6): 57–62. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16008

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

В настоящее время стало ясно, что практически при всех заболеваниях человека как инфекционной, так и неинфекционной природы происходят изменения в функционировании иммунной системы. Эти изменения могут происходить как со знаком минус, так и со знаком плюс. Может происходить как понижение иммунной реактивности организма и соответственно антиинфекционного и противоопухолевого иммунитета,

следствием чего становятся повышенная инфекционная заболеваемость и склонность к развитию хронических инфекционно-воспалительных процессов, а также онкологических заболеваний, так и активация. Во втором случае происходит повышение иммунной реактивности организма, что на первый взгляд представляется положительным явлением, в результате которого активируется антиинфекционный иммунитет и снижается

Для корреспонденции  
Пинегин Борис Владимирович –  
доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий отделом  
клинической иммунологии  
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»  
ФМБА России,  
Москва, Россия  
E-mail: bvpinegin@yandex.ru  
<http://orcid.org/0000-0002-8329-212X>

For correspondence  
Pinegin Boris V. – MD, Professor,  
Head of the Clinical immunology  
department,  
NRC Institute of Immunology  
FMBA of Russia,  
Moscow, Russia  
E-mail: bvpinegin@yandex.ru  
<http://orcid.org/0000-0002-8329-212X>

инфекционная заболеваемость. Следует помнить, что повышение иммунной реактивности лежит в основе практически всех серьезных аутоиммунных и аутореактивных воспалительных заболеваний нервной ткани, желудочно-кишечной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем, практически всех систем организма [1]. Существует достаточно тонкая грань в поддержании баланса между иммунокомпетентными клетками, учитывая то разнообразие регуляторных факторов, включая дефензины, кателицидины, цитокины и их рецепторы, низкомолекулярные медиаторы и др., которые они синтезируют, и эта грань носит сугубо индивидуальный характер. Это положение следует помнить, когда главной целью научно-исследовательской работы является создание нового иммуностропного лекарственного средства, направленного на изменение функциональной активности иммунной системы. Это положение надо также помнить при назначении с лечебной или лечебно-профилактической целью практически любого иммуностропного препарата.

На основании функциональной активности иммуностропные препараты можно разделить на две большие группы: иммуностимуляторы и иммунодепрессанты. В первом случае целью является повышение функциональной активности иммунной системы, во втором случае – понижение функциональной активности иммунной системы.

В настоящее время наиболее интенсивно развивается положение об иммуностимуляторах. В результате фундаментальных биохимических и молекулярно-генетических работ выявлена важная, а иногда и ведущая роль понижения активности иммунной системы в этиологии и патогенезе ряда тяжелых заболеваний человека, и показано, что включение иммуностимулирующих препаратов в этиотропную терапию может существенно повысить эффективность лечения. Это понимание явилось толчком для многочисленных исследований, результатом которых было создание ряда иммуностимулирующих препаратов, направленных на активацию врожденного иммунитета. Такая направленность исследований была вполне логичной, так как первой линией защиты организма от инфекции является врожденный иммунитет. Очевидно, что чем выше, до определенных пределов, функциональная активность клеток врожденного иммунитета слизистых оболочек дыхательного, желудочно-кишечного и респираторного трактов, тем меньше вероятность развития инфекционного заболевания любой этиологии. По мнению А.М. Безредки – основоположника учения о местном иммунитете, теоретически вообще существует возможность значительного снижения инфекционной заболеваемости, вплоть до полной ликвидации только на основе активации клеток врожденного иммунитета [2].

Так как микроорганизмы – главные и естественные активаторы врожденного иммунитета, микробы, их компоненты и продукты жизнедеятельности служили основным исходным материалом для создания иммуно-

стимулирующих препаратов. Исходя из этой логической посылки для стимуляции врожденного иммунитета и повышения антиинфекционной резистентности были созданы и применяются лекарственные препараты:

- на основе лизатов микроорганизмов – бронхомунал, имудон, ИРС-19, паспат;
- на основе частично очищенных компонентов бактериальной клетки, таких как липополисахариды – продигозан, пирогенал, лентинан;
- на основе рибосом – рибомунил;
- на основе нуклеиновых кислот – нуклеинат натрия, ридостин;
- на основе фрагментов пептидогликанов клеточной стенки микроорганизмов – Ликопид®, полимурамил и иммуномакс [3].

Все указанные препараты зарегистрированы как иммуностропные лекарственные средства и рекомендуются для лечения ряда заболеваний с нарушениями иммунитета и прежде всего с понижением функциональной активности иммунной системы. Перечисленные препараты обладают иммуностимулирующими свойствами и, без сомнения, могут оказывать определенный лечебный эффект при грамотном применении. Однако многие из этих препаратов имеют один существенный недостаток, который является принципиальным на современном этапе развития иммунологической науки, а именно: за небольшим исключением, не установлен механизм действия лекарственного средства на клеточном и молекулярном уровне, не идентифицирован и не выделен в чистом виде активный компонент. Этот недостаток особенно очевиден, когда в теоретической иммунологии сделан принципиальный рывок в изучении биохимических и молекулярно-генетических механизмов взаимодействия клеток иммунной системы и чужеродных агентов как экзогенной (микроорганизмы), так и эндогенной (аутоантигены), природы, что дало возможность сформулировать основные требования к создаваемым иммуностимулирующим препаратам. Эти требования основываются на трех положениях: о патоген/микроб-ассоциированных молекулярных паттернах (pathogen/microbial-associated molecular pattern – PAMP/MAMP), о паттерн-распознающих рецепторах (pattern-recognition receptor – PRR) и о сигнальных путях, активируемых при взаимодействии лиганда (PAMP) с рецептором (PRR).

Практически у всех микроорганизмов, в том числе и у патогенных, идентифицированы биологически активные компоненты – паттерны (PAMP/MAMP), ответственные за связывание с рецепторами клеток врожденного иммунитета. Это связывание вызывает в клетках врожденного иммунитета активацию соответствующих сигнальных путей и экспрессию соответствующих генов, что в конечном итоге ведет к повышению антиинфекционной резистентности организма. Задачей теоретической иммунологии является идентификация таких фрагментов и разработка методов их выделения. Если поставлена цель создания нового иммуностропного лекарственного средства, направленного на

активацию иммунитета, то современное состояние иммунологической науки требует получения препаратов МАМР/РАМР в химически чистом виде. Эти препараты должны представлять собой минимальные биологически активные фрагменты исходного микроба, воспроизводящие его иммуностимулирующие эффекты, но не оказывающие токсического и пирогенного эффекта на организм. Преимуществом пользуются препараты, имеющие достаточно простую химическую структуру, позволяющую получать их с помощью химического синтеза. Следует отметить, что эффективными иммуностимуляторами являются сами бактериальные клетки. Наибольшей иммуностимулирующей активностью в составе бактериальной клетки обладают ДНК, содержащая неметилованные CpG-последовательности, и клеточная стенка, главным компонентом которой является пептидогликан, содержащий мурамилпептидные соединения. Эти вещества являются уникальными для прокариотов.

Принципиально важным как для фундаментальной, так и для клинической иммунологии оказалось обнаружение на поверхности и в цитоплазме клеток иммунной системы сигнальных паттерн-распознающих рецепторов (PRR), ответственных за взаимодействие с различными чужеродными агентами, прежде всего – с МАМР/РАМР. Среди PRR наибольшее значение в норме и патологии человека имеют три семейства: Toll-подобные рецепторы (TLR), NOD-подобные рецепторы (NLR) и RIG-подобные рецепторы (RLR). Все эти рецепторы экспрессируются на профессиональных иммунных клетках врожденной иммунной системы (нейтрофилы, моноциты/макрофаги, дендритные клетки и др.) [4–8]. Важно отметить, что практически все виды PRR, а также компоненты инфламмосомы, лектины С-типа, протеин-киназные рецепторы PRRs экспрессируются и на эпителиальных клетках дыхательного, желудочно-кишечного, урогенитального трактов, и на кератиноцитах [9]. Все эти клетки условно можно рассматривать как часть врожденной иммунной системы. С помощью всех этих рецепторов профессиональные и непрофессиональные клетки иммунной системы могут распознавать практически любые консервативные структуры как патогенных, так и непатогенных микробов, а также эндогенные структуры данного организма, видоизмененные ксенобиотиками, в результате мутаций, в течение воспалительного процесса и пр.

Взаимодействие PRR, локализованного на профессиональных и непрофессиональных клетках врожденного иммунитета, с лигандами МАМР/РАМР ведет к последовательной активации соответствующих сигнальных путей, приводящих к активации факторов транскрипции семейства NF-κB. При активации фактора NF-κB в клетках врожденного иммунитета, как профессиональных, так и непрофессиональных, происходит усиление экспрессии нескольких сотен генов, в результате чего индуцируется синтез воспалительных цитокинов и хемокинов, антимикробных

белков и пептидов, коагуляционных факторов и метаболических регуляторов [10], а также активных форм кислорода [11–13]. Следствием этих изменений является существенное повышение антиинфекционной резистентности, что является главной целью иммуностимулирующей терапии.

Разработка понятий PRR и МАМР/РАМР сняло иммунофармакологию с эмпирических рельсов и поставило ее на сугубо научную основу, где можно четко обозначить цели и задачи исследования, прогнозировать результаты и оценивать значимость полученных результатов. Идентификация конкретных сигнальных путей, активированных соответствующим иммуностимулятором, позволяет существенно снизить вероятность развития побочных эффектов (токсических и пирогенных), возможных при проведении иммуностимулирующей терапии. Поэтому мы считаем, что на современном этапе развития иммунофармакологии для препарата, который применяется у человека с целью повышения иммунитета, должны, как минимум, быть определены:

1. химическая структура активного начала лекарственного средства и разработаны методы его синтеза, максимально простые и промышленно приемлемые;
2. рецептор клеток иммунной системы, с которым связывается активное начало;
3. сигнальный путь, который возникает при связывании лекарственного средства с рецептором клеток иммунной системы.

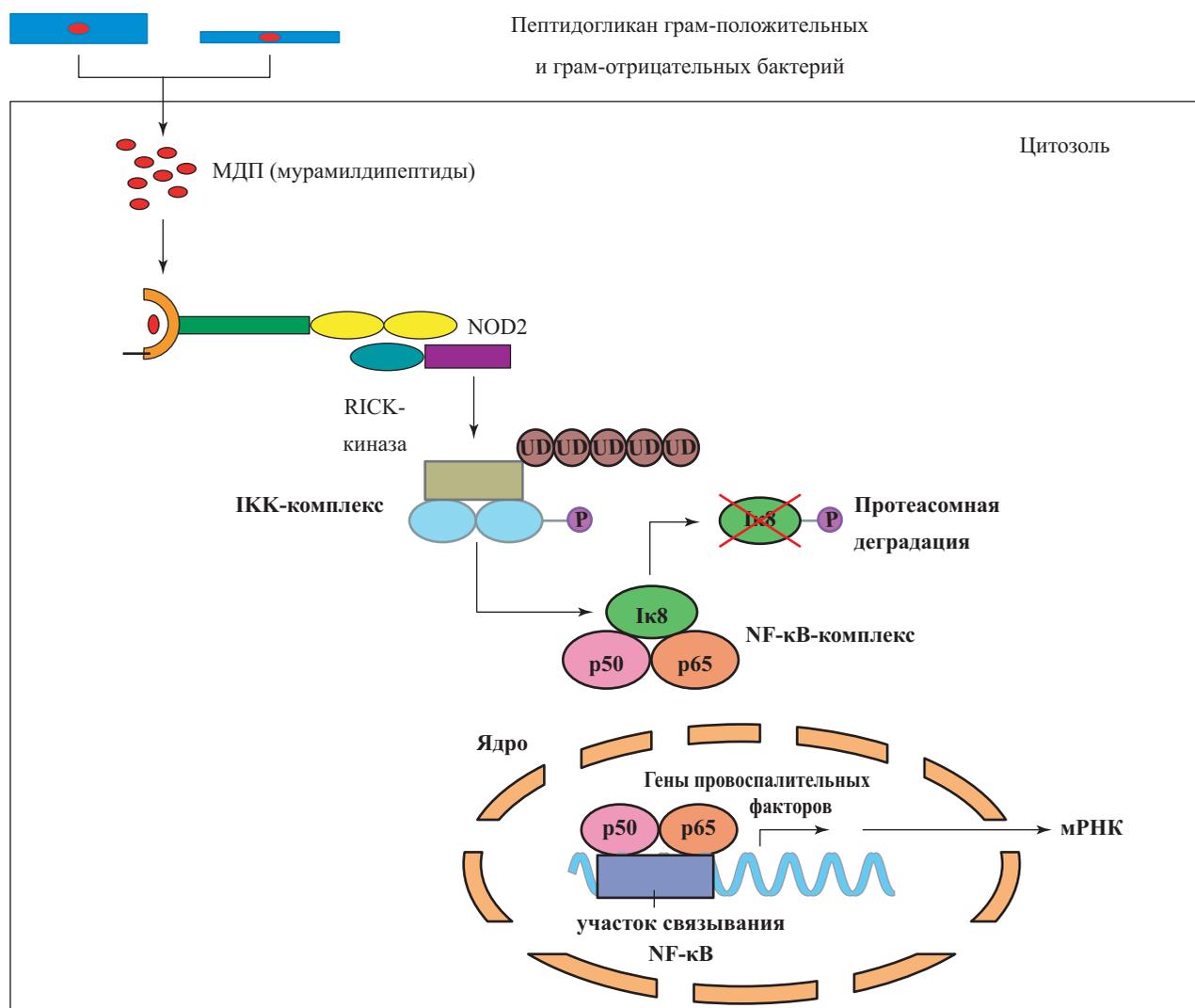
Анализируя иммуностимулирующие лекарственные средства, разрешенные к медицинскому применению в Российской Федерации, следует констатировать, что, за небольшим исключением, в нашей стране нет препаратов, которые полностью соответствуют сформулированным выше требованиям. Исключение составляет препарат Ликопид<sup>®</sup>, представляющий собой химически чистое вещество, воспроизводящее фрагмент пептидогликана клеточной стенки бактерий. Основанием для его создания являлись данные, цитированные выше, о способности пептидогликана стимулировать иммунитет. В результате поиска компонента, ответственного за иммуностимулирующий эффект, был выделен минимальный фармакологически активный фрагмент пептидогликана мурамилдипептид – N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, МДП/MDP), воспроизводящий полностью иммуностимулирующие свойства исходного пептидогликана [14, 15], но сохраняющий повышенную пирогенность, что препятствовало применению его в лечебных целях. Присоединение остатка глюкозамина к МДП позволило впервые получить вещество глюкозаминилмурамил дипептид (ГМДП/GMDP), полностью идентичное повторяющемуся фрагменту углеводной части клеточной стенки всех известных бактерий, лишенное токсических и пирогенных свойств при полном сохранении иммуностимулирующих свойств исходного пептидогликана. ГМДП является лечебным началом (действующим веществом) иммуностимулятора Ликопид<sup>®</sup> [16].

Прежде всего у Ликопада® полностью охарактеризован химический состав и он является полным аналогом природного фрагмента пептидогликана клеточной стенки всех бактерий. Охарактеризован клеточный рецептор, с которым Ликопад® связывается при попадании в организм. Этим рецептором является цитозольный NOD2-рецептор. Важно отметить, что NOD2-рецептор выявляется не только в клетках иммунной системы, но и в эпителиальных клетках слизистых оболочек, которые обладают практически всеми защитными свойствами клеток врожденного иммунитета, за исключением фагоцитоза. Связывание Ликопада® с NOD2-рецептором ведет к активации нескольких сигнальных путей, наиболее важным из которых является путь, связанный с транскрипционным фактором NF-κB. Активация его происходит в профессиональных и непрофессиональных клетках врожденного иммунитета [16–20] (см. рисунок).

Главной мишенью Ликопада® являются клетки врожденного иммунитета: усиливается функциональная активность нейтрофилов, моноцитов/макрофагов,

НК-клеток, повышается синтез провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ФНОα, ИЛ-6, ИНФ 1-го типа и ИНФγ. Особо хочется отметить способность Ликопада® напрямую повышать антимикробную активность организма путем индукции активных форм кислорода и синтеза бактерицидных белков и пептидов.

Согласно официальной инструкции по медицинскому применению, Ликопад®, таблетированная форма, относится к фармакологической группе иммуномодулирующих средств. Он разрешен к медицинскому применению у детей (1 мг) и взрослых (1 и 10 мг) в комплексе с этиотропными препаратами при терапии хронических, вялотекущих, рецидивирующих инфекционно-воспалительных процессов кожи и мягких тканей, дыхательных путей, при герпесе, туберкулезе, а также при псориазе у взрослых. Применение Ликопада® в комплексной терапии этих заболеваний позволяет значительно повысить эффективность антибактериальной, противогрибковой и противовирусной терапии, сократить продолжительность лечения и существенно снизить дозу химиотерапевтических средств.



Активация NOD2-рецептора мурамилпептидами (по Strober et al., 2006 [20] с изменениями)

Помимо лечебного, Ликопид® оказывает профилактическое действие в отношении ряда заболеваний. Так, сублингвальное применение Ликопида® в группе часто и длительно болеющих детей позволяет снижать частоту респираторных инфекций более чем в 2 раза [21]. Перспективным является применение новых схем назначения Ликопида®. Показано, что у мышей, зараженных вирусом гриппа, внутривенное введение МДП вызывает миграцию моноцитов в легкие, повышенную продукцию в легких ИНФ-1 и повышенную выживаемость животных. У мышей с нокаутом по гену *NOD2* не происходило миграции моноцитов в легкие, продукции ИНФ-1 и повышения выживаемости [22]. Эти данные стимулируют изучение возможностей применения Ликопида® для лечения и профилактики гриппа и респираторных инфекций. Ликопид® имеет такой же, как и МДП, механизм действия, но, в отличие от МДП, обладает рядом преимуществ, в частности – отсутствием пирогенного эффекта. Не исчерпаны перспективы применения иммуностимуляторов при лечении и профилактике онкологических заболеваний. Учитывая положительный опыт применения мифамуртида (Mifamurtide), синтетического аналога МДП, при лечении сарком [23], является целесообразным исследование схем приме-

нения Ликопида®, имеющего аналогичный механизм действия на иммунную систему, для лечения онкологических заболеваний. В экспериментальных исследованиях на моделях перевиваемых опухолей продемонстрирована способность препарата Ликопид® угнетать рост опухолевых клеток и их метастазирование, увеличивая продолжительность жизни животных [24], а также восстанавливать гемопоэз после химио- и лучевой терапии [25]. Нейтропения и тромбоцитопения являются основными причинами неэффективности противовирусной терапии, в том числе хронического гепатита С, не позволяющими пациентам провести весь курс лечения. Применение препарата Ликопид® позволило скорректировать цитопению и завершить курс противовирусной терапии [26].

Таким образом, большой интерес, возникший в 1970-х годах в России, Франции, Японии и других странах, к препаратам мурамилпептидного ряда для лечения и профилактики инфекционных и злокачественных заболеваний, нашел подтверждение в многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях, а открытие специфических рецепторов послужило патогенетическим обоснованием их применения при широком спектре заболеваний.

## ■ Литература

- Hotamisligil G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010; 140: 900–17.
- Безредка А.М. О значении раздражителей в инфекции и иммунитете. *Журн. эксперим. биол. и мед.* 1927; 7 (18): 265–70.
- Козлов И.Г. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотики: тонкости взаимодействия. *РМЖ*. 2018; 8 (1): 19–27.
- Du X., Poltorak A., Wei Y., Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Netw.* 2000; 11: 362–71.
- Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M. et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 41 702–8.
- Lemaire B., Nicolas E., Michaut L. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86: 973–83.
- Medzhitov R., Janeway C. Innate Immunity. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 338–44.
- Yoneyama M., Fujita T. Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 15 315–8.
- Akira S., Takeda K., Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 675–80.
- Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modification. *Nature*. 2007; 447: 972–8.
- Kim H.J., Kim C.H., Kim M.J., Ryu J.H. et al. The induction of pattern-recognition receptor expression against influenza A virus through Duox2-derived reactive oxygen species in nasal mucosa. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2015; 53: 525–35.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Immunol.* 2001; 1: 135–45.
- Qiu H.N., Wong C.K., Chu I.M., Hu S. et al. Muramyl dipeptide mediated activation of human bronchial epithelial cells interacting with basophils: a novel mechanism of airway inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 2013; 172: 81–94.
- Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974; 59: 1317–25.
- Lederer E. New developments in the field of synthetic muramyl peptides, especially as adjuvants for synthetic vaccines. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1986; 12 (6–7): 429–40.
- Иванов В.Т., Хаитов Р.М., Андропова Т.М. Пинегин Б.В. Ликопид (глюкозаминилмурамилдипептид) – новый отечественный высоко эффективный иммуномодулятор для лечения и профилактики заболеваний, связанных со вторичной иммунологической недостаточностью. *Иммунология*. 1996; 2: 4–6.
- Пинегин Б.В., Андропова Т.М. Некоторые теоретические и практические вопросы клинического применения иммуномодулятора ликопида. *Иммунология*. 1998; 18: 60–3.
- Пинегин Б.В., Пашенков М.В. Иммуномодуляторы мурамилпептидной природы в лечении и профилактике инфекционно-воспалительных процессов. *Иммунология*. 2019; 40: 75–80.
- Mijošek V., Lasitschka F., Warth A., Zabeck H. et al. Endoplasmic reticulum stress is a danger signal promoting innate inflammatory responses in bronchial epithelial cells. *J. Innate Immun.* 2016; 8 (5): 464–78.
- Strober W., Murray P., Kitani A. et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; (6): 9–20. <https://doi.org/10.1038/nri1747>
- Кириухин А.В., Парфёнова Н.А., Максимова Т.А. и др. Оптимизация лечения часто и длительно болеющих детей: иммунокоррекция Ликопидом. В кн.: Ликопид в комплексном лечении и профилактике иммунодефицитных состояний. М., 2005: 57–64.
- Coulombe F., Fiola S., Akira S., Cormier Y. et al. Muramyl dipeptide induces NOD2-dependent Ly6C(high) monocyte recruitment to the lungs and protects against influenza virus infection. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36734.
- Anderson P.M. Immune therapy for sarcomas. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017; 995: 127–40.
- Козлов И.Г., Воронина Е.В., Валякина Т.И., Симонова М.А. и др. Ликопид в иммунотерапии опухолей обзор экспериментальных исследований. *Вопр. гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2011; 10 (2): 32–8.
- Андропова И.Е., Филимонова Г.И., Андропова Т.М. Влияние иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида на кровяное тельце мышей с экспериментальной цитопенией. *Радиобиология*. 1992; 32 (4): 566–70.
- Манапова Э.Р., Фазылов В.Х., Гурьянова С.В. Цитопении и их коррекция при противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов с генотипом 1. *Вопр. вирусол.* 2017; 62 (4): 174–8.

## ■ References

- Hotamisligil G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010; 140: 900–17.
- Bezredka A.M. On the importance of irritants in infection and immunity. *Zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 1927; 7 (18): 265–70. (in Russian)
- Kozlov I.G. Microbiota, mucosal immunity and antibiotics: the fineness of the interaction. *RMZh*. 2018; 8 (1): 19–27. (in Russian)
- Du X., Poltorak A., Wei Y., Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Netw*. 2000; 11: 362–71.
- Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 41 702–8.
- Lemaire B., Nicolas E., Michaut L., et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86: 973–83.
- Medzhitov R., Janeway C. Innate Immunity. *N. Engl. J. Med*. 2000; 343: 338–44.
- Yoneyama M., Fujita T. Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Biol. Chem*. 2007; 282: 15 315–8.
- Akira S., Takeda K., Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol*. 2001; 2: 675–80.
- Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modification. *Nature*. 2007; 447: 972–8.
- Kim H.J., Kim C.H., Kim M.J., Ryu J.H., et al. The induction of pattern-recognition receptor expression against influenza A virus through Duox2-derived reactive oxygen species in nasal mucosa. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2015; 53: 525–35.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Immunol*. 2001; 1: 135–45.
- Qiu H.N., Wong C.K., Chu I.M., Hu S., et al. Muramyl dipeptide mediated activation of human bronchial epithelial cells interacting with basophils: a novel mechanism of airway inflammation. *Clin. Exp. Immunol*. 2013; 172: 81–94.
- Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1974; 59: 1317–25.
- Lederer E. New developments in the field of synthetic muramyl peptides, especially as adjuvants for synthetic vaccines. *Drugs Exp. Clin. Res*. 1986; 12 (6–7): 429–40.
- Ivanov V.T., Khaitov R.M., Andronova T.M. Pinegin B.V. Likopid (glucosaminylmuramyl dipeptide) is a new domestic highly effective immunomodulator for the treatment and prevention of diseases associated with secondary immunological deficiency. *Immunologiya*. 1996; 2: 4–6. (in Russian)
- Pinegin B.V., Andronova T.M. Some theoretical and practical issues of the clinical use of the immunomodulator lycopid. *Immunologiya*. 1998; 18: 60–3. (in Russian)
- Pinegin B.V., Pashchenkov M.V. Muramyl peptide immunomodulators in the treatment and prevention of infectious and inflammatory processes. *Immunologiya*. 2019; 40: 75–80. (in Russian)
- Mijošek V., Lasitschka F., Warth A., Zabeck H., et al. Endoplasmic reticulum stress is a danger signal promoting innate inflammatory responses in bronchial epithelial cells. *J. Innate Immun*. 2016; 8 (5): 464–78.
- Strober W., Murray P., Kitani A., et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*. 2006; (6): 9–20. <https://doi.org/10.1038/nri1747>
- Kiryukhin A.V., Parfyonova N.A., Maksimova T.A., et al. Optimization of treatment for frequently and long-term ill children: immunocorrection with *Lycopodium*. In: *Lycopid in the complex treatment and prevention of immunodeficiency states*. Moscow, 2005: 57–64. (in Russian)
- Coulombe F., Fiola S., Akira S., Cormier Y., et al. Muramyl dipeptide induces NOD2-dependent Ly6C(high) monocyte recruitment to the lungs and protects against influenza virus infection. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36734.
- Anderson P.M. Immune therapy for sarcomas. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2017; 995: 127–40.
- Kozlov I.G., Voronina E.V., Valyakina T.I., Simonova M.A., et al. Licopid in immunotherapy of tumors: Review of experimental research (review of literature). *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii*. 2011; 10 (2): 32–8. (in Russian)
- Andriyanova I.E., Filimonova G.I., Andronova T.M. The effect of the immunomodulator glucosaminyl muramyl dipeptide on hematopoiesis of mice with experimental cytopenia. *Radiobiology*. 1992; 32 (4): 566–70. (in Russian)
- Manapova E.R., Fazylov V.Ch., Guryanova S.V. Cytopenias and their correction during antiviral therapy of chronic hepatitis C in patients with genotype 1. *Voprosy virusologii*. 2017; 62 (4): 174–8. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2019

Лушова А.А.<sup>1</sup>, Жеремян Э.А.<sup>2</sup>, Астахова Е.А.<sup>2</sup>, Спиридонова А.Б.<sup>3</sup>,  
Бязрова М.Г.<sup>1</sup>, Филатов А.В.<sup>1</sup>

## Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры

<sup>1</sup> ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, 115522, г. Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)», 119991, г. Москва, Россия

### Резюме

Традиционно В-клеточному звену иммунной системы отводится роль в регуляции гуморального иммунного ответа, связанная со способностью В-лимфоцитов секретировать защитные антитела. Однако все больше авторов указывают на широкий спектр процессов, регулируемых В-клетками. Способность В-клеточной популяции принимать участие в различных процессах обусловлена существованием множества субпопуляций В-лимфоцитов. Изучение взаимосвязи между функциями В-лимфоцита и экспрессируемыми им поверхностными маркерами является одной из важнейших задач современной иммунологии. В настоящем обзоре рассмотрены происхождение и формирование различных субпопуляций В-лимфоцитов в ходе онтогенеза. Проанализировано изменение молекулярного фенотипа на каждой стадии: про-В-лимфоцитов, пре-В-лимфоцитов, незрелых В-клеток, транзиторных В-клеток, а также зрелых наивных В-клеток. Даны характеристики субпопуляций В-1, В-2 и MZB. Описаны пути дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки, В-клетки памяти и регуляторные В-лимфоциты. Обозначены основные функции, выполняемые каждой субпопуляцией, обобщены литературные данные о характерных клеточных маркерах, используемых для иммунофенотипирования В-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** гуморальный иммунный ответ; субпопуляции В-лимфоцитов; плазматические клетки; В-клетки памяти; регуляторные В-лимфоциты; дифференцировка В-лимфоцитов; В-клетки; иммунофенотипирование; обзор

Статья поступила 11.09.2019. Принята в печать 16.10.2019.

**Для цитирования:** Лушова А.А., Жеремян Э.А., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Бязрова М.Г., Филатов А.В. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры. Иммунология. 2019; 40 (6): 63–76. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16009

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Фонда перспективных исследований.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Lushova A.A.<sup>1</sup>, Zheremyan E.A.<sup>2</sup>, Astakhova E.A.<sup>2</sup>, Spiridonova A.B.<sup>3</sup>,  
Byazrova M.G.<sup>1</sup>, Filatov A.V.<sup>1</sup>

## B-lymphocyte subsets: functions and molecular markers

<sup>1</sup> National Research Center – Institute of immunology of Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia

<sup>3</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russia

### Abstract

Traditionally, the B-cell component of the immune system has been casting a role for regulating the humoral immune response due to the ability of B-lymphocytes to secrete protective antibodies. However, a growing number of authors draw attention to a wide range of processes regulated by B-cells. The ability of the B-cell population to participate in various immunological processes is caused by the existence of diverse B-lymphocytes subsets. The study of the relationship between the functions of the B-lymphocyte and molecular markers, expressed

Для корреспонденции  
Филатов Александр Васильевич –  
доктор биологических наук,  
профессор,  
заведующий лабораторией  
иммунохимии  
ФГБУ «ГНЦ «Институт  
иммунологии»  
ФМБА России,  
Москва, Россия  
E-mail: avfilat@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>

For correspondence  
Filatov Alexander V. –  
Dr.Sci., PhD, Professor,  
Head of Immunochemistry Laboratory,  
NRC Institute of Immunology  
FMBA of Russia, Moscow, Russia  
E-mail: avfilat@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>

on its membrane, is one of the most important tasks of current immunology. This review is devoted to a considering the origin and formation of various subsets of B-lymphocytes during ontogenesis. Changes in the molecular phenotype at each stage: pro-B-lymphocytes, pre-B-lymphocytes, immature B-cells, transient B-cells, as well as mature naive B-cells are reviewed. Characteristics of B-1, B-2 and MZB subsets are provided. The pathways of differentiation of B-lymphocytes into plasma cells, memory B-cells and regulatory B-lymphocytes are described. The present review gives the outline of the main functions performed by each subset, summarizes literature data concerning the specific cell markers used for immunophenotyping of B-lymphocytes.

**Keywords:** humoral immune response; B-lymphocyte subsets; plasma cells; memory B-cells; regulatory B-lymphocytes; B-lymphocyte differentiation; B-cells; immunophenotyping; review

Received 11.09.2019. Accepted 16.10.2019.

**For citation:** Lushova A.A., Zheremyan E.A., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., Byazrova M.G., Filatov A.V. B-lymphocyte subsets: functions and molecular markers. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 63–76. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16009

**Funding.** The study was supported by Advanced Research Foundation.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

## Введение

Анализ клеточного состава лимфоцитов крови человека – основной компонент в оценке иммунного статуса. В-клетки – важное звено иммунитета, им отведена главная роль в обеспечении гуморального иммунного ответа. Популяция В-клеток представлена В-лимфоцитами различной степени зрелости и функциональной активности. Иммунофенотипирование позволяет судить о происхождении и функциональном состоянии В-лимфоцита по наличию того или иного набора клеточных маркеров на его мембране.

Основная характеристика В-лимфоцита – экспрессия иммуноглобулинового рецептора для распознавания антигенов – BCR (B-cell receptor). На поверхности зрелой В-клетки содержится около 150 000 комплексов BCR [1]. Помимо специфического комплекса BCR, на мембране В-лимфоцита экспрессируется большой набор различных молекул, являющихся рецепторами, корецепторами, лигандами, транспортерами или молекулами адгезии. Вместе они обеспечивают активацию В-клеток, их миграцию в организме и, в конечном счете, выполнение их функции в составе иммунной системы.

### 1. Развитие и дифференцировка В-лимфоцитов в ходе онтогенеза

Образование В-лимфоцитов начинается во время эмбрионального развития и продолжается в течение всей жизни организма. В эмбриональный период этот процесс локализуется в печени и костном мозге, а у взрослых млекопитающих – только в костном мозге. Дифференцировка В-лимфоцитов проходит в несколько этапов, и каждый из них характеризуется присутствием определенных белковых маркеров и степенью генетической перестройки генов иммуноглобулинов.

В-лимфоцит берет начало от стволовой клетки с последующей дифференцировкой в общий лимфоидный предшественник (CLP – common lymphoid progenitor), лишенный поверхностных линейных маркеров, при-

сущих основным линиям кроветворных клеток. Подобно стволовым клеткам, CLP экспрессирует молекулу CD34, а также панлейкоцитарный маркер CD45RA (изоформа CD45). В процессе созревания CLPs, несущие на поверхности CD10, начинают дополнительно экспрессировать рецептор интерлейкина-7 (ИЛ-7) (IL-7R $\alpha$ /CD127) и дают начало В-лимфоцитам [2]. Далее под действием сигналов, получаемых от стромальных клеток костного мозга, В-клетки последовательно проходят следующие стадии:

- 1) про-В-лимфоциты (progenitor B cell, pro-B), которые подразделяются на ранние (pro-B-I) и поздние (pro-B-II);
- 2) пре-В-I-клетки (precursor B cell) и пре-В-II-клетки, известные также как большие пре-В (large-pre-B) и малые пре-В (small-pre-B);
- 3) незрелые В-клетки (immature B cell);
- 4) транзиторные В-клетки (transient B cell, T);
- 5) зрелые наивные В-клетки (mature naive B cell).

Последние 2 стадии могут быть пройдены В-лимфоцитами уже после выхода из костного мозга, на периферии: в селезенке или региональных лимфоузлах.

Основной процесс, протекающий на перечисленных стадиях развития В-лимфоцитов, – формирование BCR, происходящее за счет перестройки варибельных генов (V-генов) иммуноглобулинов. В ранних pro-B-I-лимфоцитах начинается внутриклеточная секреция I $\gamma$ a (CD79a), являющегося компонентом BCR. Молекула CD19 – один из самых ранних поверхностных маркеров, позволяющих отнести лимфоцит к В-клеточному ряду. CD19 появляется на поверхности В-лимфоцитов на стадии pro-B-II и впоследствии локализуется с В-клеточным рецептором в одном липидном рафте. В работе [3] говорится о начале экспрессии CD19 совместно с CD81, образующим впоследствии вместе с молекулой CD21 В-лимфоцитарный корецепторный комплекс.

Кроме того, стадия pro-B-II характеризуется началом перестройки V-генов тяжелых (H) цепей иммуноглобу-

линов. Результатом успешно прошедшей перестройки является формирование пре-В-клеточного рецептора (пре-BCR), содержащего тяжелую  $\mu$ -цепь и суррогатную легкую (L) цепь (состоящую из продуктов генов *VpreB* и  $\lambda 5$ ). Корректное встраивание пре-BCR в мембрану клетки и его соединение с уже сформированными ко-рецепторными молекулами  $Ig\alpha$  и  $Ig\beta$  ведет к усилению экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 и переходу В-лимфоцита на стадию пре-В-I.

Пре-В-I-стадия также носит название large-пре-В из-за увеличения в размерах активно делящихся клеток и образования клонов, содержащих идентичные пре-BCR. По окончании пролиферации В-лимфоциты переходят на стадию малых пре-В-клеток (пре-В-II), в ходе которой претерпевают перестройку V-генов L-цепей иммуноглобулинов. На данной стадии перестает экспрессироваться пре-BCR, тяжелая  $\mu$ -цепь соединяется с образованной  $\lambda$ -цепью (при этом исчезает суррогатная L-цепь) и на поверхность В-лимфоцита доставляется зрелая молекула иммуноглобулина. После успешного соединения с остальными компонентами BCR ( $Ig\alpha$  и  $Ig\beta$ ) В-клетка начинает экспрессировать поверхностные иммуноглобулины класса М (IgM) и становится незрелым В-лимфоцитом.

Покидая костный мозг, незрелые В-лимфоциты проходят через несколько промежуточных стадий транзитных В-клеток (условно подразделяющихся на T1, T2 и T3). На поверхности T1-лимфоцитов появляется молекула CD24 (маркер выхода из костного мозга), а также в дополнение к IgM начинает экспрессироваться мембранная форма IgD. Было показано, что для всех транзитных стадий В-лимфоцитов характерна экспрессия лектинового трансмембранного рецептора CD93 (AA4) [4]. Молекулярный фенотип T1-лимфоцитов:  $IgM^{high}IgD^{-low}CD23^{-}CD21^{low}CD24^{high}CD93^{+}$ . Транзитные В-клетки подвергаются антиген-независимой положительной селекции, в ходе которой умеренные, тонические, сигналы через BCR обеспечивают выживание клонов. Кроме того, транзитные В-лимфоциты проходят проверку на аутореактивность, или антиген-независимую отрицательную селекцию, направленную на удаление В-клеточных клонов, BCR которых связывается с аутоантигенами с высокой аффинностью. В отличие от зрелых В-лимфоцитов, активирующихся в ответ на связывание BCR с антигеном, T2-клетки характеризуются низкой экспрессией рецептора для BAFF (B-cell activation factor), поэтому, связавшись своим BCR с аутоантигеном, эти клетки не активируются, а получают сигнал к редактированию генов BCR. Этот процесс заключается в повторной перестройке V-генов с вовлечением сегментов, не задействованных при сборке зрелого BCR в предыдущей реаранжировке. При успешном редактировании аутореактивность утрачивается [5]. Если новый BCR сохраняет способность связывать антигены, экспрессируемые на поверхности собственных клеток, то запускается процесс клональной делеции, в ходе которой аутореактивные клоны подвергаются апоптозу. Существует также третий вариант развития

событий – переход клонов в состояние анергии в ответ на связывание с аутоантигенами (обычно с растворимыми). Показано, что анергичные В-клетки преобладают в T3-пуле и только T1- и T2-лимфоциты дают начало зрелым популяциям В-лимфоцитов (В-клеткам зародышевых центров или В-лимфоцитам маргинальной зоны селезенки) [6, 7]. Фенотипы В-клеток на стадиях T2:  $IgM^{high}IgD^{high}CD21^{int}CD23^{+}CD93^{+}$  и T3:  $IgM^{low}IgD^{high}CD21^{int}CD23^{+}CD93^{+}$  [8].

Срок жизни транзитных В-клеток составляет от 1 до 5 дней, после чего они превращаются в зрелые наивные В-лимфоциты и благодаря началу экспрессии хемокинового рецептора CXCR5 мигрируют в региональные лимфоузлы, образуя В-зону первичного фолликула. Кроме того, в зрелом наивном В-лимфоците устанавливается нормальная экспрессия рецепторов BAFF/APRIL (A proliferation-inducing ligand) и в ответ на связывание BCR с антигеном они не гибнут, а активируются. Примированные антигеном В-лимфоциты перемещаются вглубь фолликула на границу с Т-зоной, превращаясь в клетки-предшественники зародышевого, или герминативного, центра (germinal center, GC). В дальнейшем они могут дифференцироваться в клетки герминативного центра – центробласты. Для В-клеток зародышевого центра характерна высокая экспрессия CD38 (фенотип  $IgD^{low}CD38^{high}$ ). Центробласты, подвергаясь соматическим гипермутациям в Ig-вариабельных участках генов, трансформируются в центроциты, экспрессирующие высокоаффинные антитела [9].

Описанные этапы дифференцировки, а также мембранные фенотипы на каждой стадии (табл. 1) характерны преимущественно для субпопуляции так называемых В2-лимфоцитов (иногда их называют обычными В-клетками). Эти клетки составляют подавляющее большинство циркулирующих В-лимфоцитов человека и играют основную роль в гуморальном иммунном ответе.

## 2. Субпопуляции В-лимфоцитов. Происхождение, характеристика фенотипов, функции

Под субпопуляциями В-лимфоцитов понимают разновидности клеток определенного типа, характеризующиеся присутствием устойчивых различий по функциям и связанным с ними молекулярным маркерам. Большинство исследований, направленных на изучение субпопуляций В-клеток, было проведено на мышах, и сведения о В-клеточных субпопуляциях человека продолжают уточняться.

На сегодняшний день выделяют 3 основные субпопуляции В-клеток: В-1-клетки, В-клетки маргинальной зоны (MZB) и обычные В-клетки (В-2). Необходимо отметить, что все субпопуляции В-лимфоцитов отличаются гетерогенностью и их часто разделяют на подгруппы на основе различий в анатомической локализации, степени дифференцировки, молекулярном фенотипе и выполняемых функциях.

### 2.1. В-2-клетки

На практике к В-2-клеткам относят большинство В-лимфоцитов, населяющих селезенку и лимфатичес-

кие узлы, а также пул рециркулирующих В-клеток крови. В течение всей жизни В-2-клетки образуются из костномозговых предшественников. Именно В-2-клетки формируют В-зону первичного лимфоидного фолликула [follicular (FO) B-cells], вовлекаются во взаимодействие с Т-лимфоцитами и образуют В-клетки зародышевых центров [germinal center (GC) B-cells] во вторичных фолликулах. В-2-лимфоциты способны к переключению изотипа (класса) иммуноглобулинов с M/D на A, E и G, а также к дифференцировке в В-клетки памяти и плазматические клетки с последующей секрецией специфических антител [10].

В-2-клетки несут на поверхности молекулы МНС-I, МНС-II, костимулирующие молекулы CD40, CD86, а при активации – также CD80, что позволяет им выполнять роль «профессиональных» антиген-презентирующих клеток (АПК) [11]. Также В-2-клетки экспрессируют молекулы адгезии ( $\beta$ 1-интегрины VLA-2 и VLA-4,  $\beta$ 2-интегрин LFA-1, L-селектин CD62L и др.), что дает им возможность мигрировать из сосудов и перемещаться в тканях. Показано, что присутствие на мембране В-2-лимфоцитов Fc-рецепторов (Fc $\gamma$ RIIB – CD32), а также рецепторов комплемента (CR2) более

необходимо для регуляции их активности, нежели для выполнения ими эффекторных функций. Чтобы поддерживать численность клеток на постоянном уровне, на мембране В-2-лимфоцитов экспрессируются рецепторы цитокинов семейства ФНО: BAFF – BAFF-R, BCMS, TAC-1, а также APRIL – HSPG, защищающие зрелые В-2-клетки от апоптоза. Кроме того, для В-2-клеток характерна экспрессия многочисленных рецепторов цитокинов (IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-2R, IL-1R, IL-10R) и хемокинов (CXCR4, CXCR5, CCR3, CCR6) [1]. Мембранный фенотип В-2-клеток: CD10<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD22<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD24<sup>low</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>. Представленный фенотип является усредненным, так как экспрессия определенных молекулярных маркеров зависит от степени зрелости, контакта с антигеном, локализации В-2-клетки и ее микроокружения.

## 2.2. В-1-клетки

В-1-клетки составляют небольшую субпопуляцию В-лимфоцитов – около 5% от общей популяции В-клеток. У человека В-1-лимфоциты преимущественно локализованы в лимфоидной ткани слизистых оболочек (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT). По различным данным, количество В-1-клеток в со-

Таблица 1. Молекулярные маркеры, экспрессируемые на В-лимфоцитах человека в процессе дифференцировки

Стадия развития	CLP	pro-B-I	pro-B-II	pre-B-I	pre-B-II
Характерные молекулярные маркеры	CD10	CD10	CD10	CD10	CD10
	CD34	CD34	CD19	CD19	CD19
	CD45RA	МНС II	CD24	CD20	CD20
			CD38	CD24	CD24
			CD40	CD38	CD38
			CD72	CD40	CD40
			CD81	CD72	CD72
			МНС II	CD81	CD79a
				CD126	CD79b
				МНС II	CD81
				CD126	
				pre-BCR	
				МНС II	
Стадия развития	Незрелые В-клетки	T1	T2	T3	Зрелые наивные В-клетки I
Характерные молекулярные маркеры	CD10	CD10	CD10	CD19	CD19
	CD19	CD19	CD19	CD20	CD20
	CD20	CD20	CD20	CD21	CD21
	CD21	CD21	CD21	CD23	CD23
	CD22	CD24	CD23	CD24	CD24
	CD24	CD38	CD24	CD38	CD32
	CD38	CD40	CD38	CD40	CD35
	CD40	CD72	CD40	CD72	CD38
	CD72	CD79a	CD72	CD79a	CD40
	CD79a	CD79b	CD79a	CD79b	CD72
	CD79b	CD81	CD79b	CD81	CD79a
	CD81	CD93	CD81	CD93	CD79b
	CD126	IgM	CD93	IgM, IgD	CD81
	IgM	МНС II	IgM, IgD	МНС II	CD269
	МНС II		МНС II		IgM, IgD
				МНС II	



В-клеток как гетерогенную популяцию, содержащую 2 типа клеток, по-разному отвечающих на одинаковые сигналы от BCR. Клетки 1-го типа, получая стимуляцию BCR, начинают пролиферировать, тогда как клетки 2-го, наоборот, подвергаются апоптозу. Две последние модели подтверждает исследование [13], в ходе которого при стимуляции CD43<sup>+</sup>-В-2-клеток памяти *in vitro* комбинацией ИЛ-2 и R-848 (резиквомод) была выделена промежуточная субпопуляция В-клеток, вероятнее всего, предшественников В-1-лимфоцитов.

Мембранный фенотип В-1-клеток: CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD70<sup>-</sup> [14]. Также В-1-клетки экспрессируют на своей поверхности костимулирующие молекулы CD80 и CD86, что дает им возможность выполнять функции АПК. В отличие от классической В-2-субпопуляции, активация В-1-клеток происходит без участия BAFF, а также без предварительного контакта с Т-клетками. Их активация, как правило, осуществляется Т-независимыми антигенами второго типа TI-2 (T-independent antigens type II), например, бактериальными поли- и липополисахаридами, через BCR и толл-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLRs) (табл. 2).

Как говорилось ранее, субпопуляции В-лимфоцитов крайне неоднородны, и В-1-субпопуляцию принято делить на В-1a и В-1b.

В-1a-клетки экспрессируют на своей поверхности молекулу CD5, отсутствующую на всех остальных В-лимфоцитах. Считается, что В-1a-клетки в онтогенезе появляются раньше других субпопуляций. В-1a-лимфоциты используют небольшой эмбриональный набор V-генов, не способны к переключению классов иммуноглобулинов и несут на своей поверхности молекулы IgM (исключение составляет экспрессия IgA В-1a-клетками в *lamina propria* кишечника). Соматический гипермутагенез в Ig-вариабельных участках генов В-1a-клеток выражен слабо или вообще не происходит. Основной их функцией является секреция естественных антител (natural antibodies, Nabs), содержащих так называемые общедоступные сайты связывания антигена (public antigen binding sites), специфичных к наиболее распространенным компонентам клеточных стенок бактерий. Показано, что Nabs представляют собой низкоаффинные поли- и аутореактивные IgM-антитела, циркулирующие в организме даже при отсутствии антигенной стимуляции. Считается, что В-1a-лимфоциты выполняют роль В-клеток врожденного иммунитета и на ранних этапах жизни замещают более специфичную, но еще не до конца развитую стандартную систему В-клеточной защиты. Также показано, что слабая аутореактивность Nabs оказывается полезной при удалении продуктов апоптоза в организме [15].

В-1b-лимфоциты могут принимать участие в адаптивном иммунном ответе, так как они проявляют способность к переключению синтеза иммуноглобулинов (чаще всего они секретируют IgM и IgG3). Однако данный процесс, как и соматический гипермутагенез в V-генах, выражен слабо. В остальном свойства В-1b-клеток схожи со свойствами В-1a-клеток.

### 2.3. MZB-клетки

В-клетки маргинальной зоны (MZB) локализируются в маргинальной зоне селезенки, отделяющей белую пульпу от красной (составляют около 15% от всех В-клеток селезенки) [16]. MZB-лимфоциты выделяются в отдельную субпопуляцию на стадии транзитных В-клеток в костном мозге. Выбор пути дифференцировки транзитной В-клетки в FO-В-лимфоцит или в MZB-лимфоцит определяется совокупностью сигналов, поступающих в клетку через BCR, а также рецепторы для дифференцировочных факторов BAFF и Noth-2 (Neurogenic locus notch homolog protein 2). В экспериментах на грызунах показано, что тонические сигналы, возникающие при связывании BCR с аутоантигеном, блокируют сигналинг через рецептор Noth-2, и T2-В-лимфоцит дифференцируется в фолликулярную В-клетку 2-го типа (FO-II). В свою очередь, слабый BCR-сигналинг не мешает образованию Noth-2-опосредованного сигнального пути, запуская тем самым дифференцировку В-клетки в MZB-лимфоцит. Показано, что пул FO-II-клеток также может давать начало MZB-лимфоцитам, тем самым являясь своеобразным запасным резервуаром для MZB-субпопуляции. Кроме того, неканоническая активация NF-κB (nuclear factor κB signaling pathway) ведет к формированию FO-В-клеточной субпопуляции 2-го типа (FO-II), тогда как активация NF-κB по классическому пути способствует развитию T2-клеток в MZB-лимфоциты либо в фолликулярные В-клетки 1-го типа (FO-I), которые не обладают способностью дифференцироваться в MZB-клетки [17].

Зрелые MZB-лимфоциты не экспрессируют на своей мембране хемокиновый рецептор CXCR5, поэтому не попадают в лимфоидные фолликулы подобно В-2-клеткам, а осуществляют «челночные» миграции до фолликулов и обратно, получая информацию об антигенах, поступающих в селезенку с кровью. MZB-клетки сходны по своему фенотипу с активированными В-2-лимфоцитами. Маркером, указывающим на недавний контакт с антигеном, является молекула CD27, экспрессируемая на поверхности MZB-лимфоцитов.

V-гены MZB-клеток редко затрагиваются мутациями, что объясняется их развитием вне зародышевых центров. В этих клетках не происходит переключения классов иммуноглобулинов, и даже MZB-клетки памяти несут на своей поверхности IgM, а не IgG. Основной мембранный иммуноглобулин MZB-клеток – IgM – экспрессируется сильнее, чем на В-2-клетках, а IgD присутствует на мембране в малом количестве.

Характерной особенностью MZB-лимфоцитов является их способность принимать участие в иммунном ответе как на Т-зависимые, так и на Т-независимые антигены (TI-2) (табл. 2). Это позволяет рассматривать MZB-лимфоциты в качестве промежуточного клеточного звена между врожденным и адаптивным иммунитетом. Подобно В-2-клеткам MZB-клетки экспрессируют молекулы MHC-II и костимулирующие молекулы CD80 и CD86, благодаря которым способны связывать анти-

**Таблица 2.** Типы антигенов в зависимости от необходимости участия Т-клеток в запуске гуморального иммунного ответа

Характерные особенности	Т-независимые		Т-зависимые (T-dependent antigens, TD)
	1-го типа (T-independent antigens type I, TI-1)	2-го типа (T-independent antigens type II, TI-2)	
Участие Т-клеток для активации В-клеток	Способны активировать В-клетки без участия Т-клеток		Активация В-клеток, связавших TD-антиген, происходит после взаимодействия с Т-клетками и образования В-Т-конъюгата
Субпопуляции В-клеток, вовлеченных в иммунный ответ	MZB-клетки, В-1b-клетки (но могут быть и В-2-клетки)		В-2-клетки, MZB-клетки
	Незрелые В-клетки	При отсутствии цитокинов, вырабатываемых Т-клетками, незрелые В-клетки не могут быть активированы	
Природа антигена	Чаще всего митогены	Длинные полимерные молекулы, работающие как мультивалентные антигены (часто бактериальные полисахариды)	Чаще всего белковые молекулы
Механизм активации В-клетки	Сайт связывания TI-1-антигена с В-клеткой не уникальный, часто затрагивает не только антиген-связывающий участок BCR. Происходит поликлональная активация В-клеток	TI-2-антигены, содержащие много повторяющихся эпитопов, вызывают кросс-связывание сразу нескольких BCR, тем самым активируя В-клетку	Активация В-клетки происходит по классической 3-сигнальной модели (Td activation 3 signal model): 1. Связывание TD-антигена с BCR. 2. Представление TD-антигена В-клеткой в комплексе с MHC-II Т-клетке, активированной тем же антигеном, и получение дополнительных костимулирующих сигналов в составе В-Т-конъюгата. 3. Окончательная активация В-клетки с помощью цитокинов, вырабатываемых Т-клеткой
Разнообразие антител, секретируемых в ходе иммунного ответа	Не происходит соматического гипермутагенеза в V-генах В-клеток, отсюда малое разнообразие вырабатываемых антител		Характерно большое разнообразие секретируемых антител за счет соматического гипермутагенеза в В-клетках
Классы иммуноглобулинов, секретируемых в ходе иммунного ответа	В-клетки не подвергаются процессу переключения класса Ig. Секретируют преимущественно иммуноглобулины класса М		Характерно переключение изотипов секретируемых антител и, как следствие, наличие иммуноглобулинов различных классов (IgG, IgA, IgE)
Наличие В-клеток памяти. Тип антителосинтезирующих клеток	Как правило, В-клетки памяти не вырабатываются в ответ на TI-антигены. Образованные плазматические клетки короткоживущие		В ответ на TD-антигены всегда образуются В-клетки памяти. Образованные плазматические клетки коротко- или долгоживущие
Наличие иммунологической памяти после инфекции	При повторном взаимодействии с TI-антигеном иммунный ответ реализуется на первичном уровне		При повторном взаимодействии с TD-антигенами характерно развитие вторичного иммунного ответа
Скорость иммунного ответа	Быстрый ответ на взаимодействие с TI-антигенами (часы, дни)		Медленный ответ на взаимодействие с TD-антигенами (дни, недели)

ген (часто представляемый им дендритными клетками маргинальной зоны), мигрировать в Т-зависимую зону селезенки и презентировать его Т-хелперным клеткам. Также характерной особенностью MZB-лимфоцитов является экспрессия молекулы CD1d, участвующей в презентации липидных антигенов инвариантным натуральным Т-киллерам (invariant natural killer T-cells,

iNKT) [18]. Аналогично В-1-клеткам MZB-лимфоциты способны взаимодействовать с полимерными повторами эпитопов TI-2-антигенов (например, с бактериальными полисахаридами) [19]. В данном процессе весьма существенен маркер CD21, экспрессия которого ярко выражена на поверхности MZB-клеток. CD21, являющийся рецептором C3d-компонента комплемента,

обеспечивает ассоциацию связавшего антиген BCR с корецептором CD19. Образование такого тройного комплекса существенно снижает порог активации низкоаффинными антигенами и позволяет MZB-клеткам активироваться в отсутствие Т-клеточной помощи [20]. Мембранный фенотип MZB-клеток: CD27<sup>var</sup>CD25<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD23<sup>low</sup>CD21<sup>high</sup>CD1<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> [1, 21].

### 3. Встреча В-лимфоцита с антигеном.

#### Пути дифференцировки

Основным фактором гуморальной ветви иммунитета в ответ на попадание в организм чужеродного антигена являются антитела. Антителообразующие клетки представляют собой производные В-лимфоцитов. В течение первых минут/часов после инфицирования с антигеном способны связаться только циркулирующие Nabs, секретируемые В-1а-клетками. Несколько часов/суток требуется MZB-клеткам и В-1в-клеткам для выработки антител IgM и IgG3 в обход взаимодействия с Т-клетками (такой тип иммунного ответа развивается, как правило, на TI-антигены). Наконец, самый отсроченный (несколько дней/недель), но наиболее тонко настроенный иммунный ответ представлен специфическими антителами (IgG, IgA, IgE), полученными из плазматических клеток – в подавляющем большинстве случаев производных клонов В-2-клеток, прошедших антиген-зависимую селекцию в зародышевых центрах лимфоидных фолликулов. Описанный тип иммунного ответа вызывают Т-зависимые антигены (T-dependent antigens, TD). Более подробные сведения о различиях в иммунном ответе на TI- и TD-антигены представлены в табл. 2.

Наиболее хорошо изучен иммунный ответ на TD-антигены, реализуемый в соответствии с трехсигнальной моделью активации В-клетки (three signal model of B cell activation by TD antigen) [22]. В рамках данной модели для полной активации В-лимфоциту необходимо получить 3 последовательных сигнала:

1. Первый сигнал зрелая наивная В-клетка с молекулярным фенотипом IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>low</sup>, находящаяся в «восприимчивом» состоянии (cognitive state), получает при связывании BCR с антигеном (в свободной форме либо презентированным дендритными клетками). При этом для того, чтобы первый сигнал прошел, В-лимфоцит должен связать сразу несколько молекул антигена. Связывание хотя бы 10–12 молекул антигена ведет к появлению на поверхности клетки так называемых BCR-микрочластеров (BCR-microclusters). Необходимо отметить, что В-клеточные эпитопы антигена распознаются В-лимфоцитом при помощи BCR, тогда как Т-клеточные эпитопы встраиваются в состав МНСII, подготавливая лиганд для TCR. Примерно через 12 ч после этого события В-клетка увеличивается в размерах и переходит в рецептивное состояние (receptive state, молекулярный фенотип IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>dim</sup>), в котором мигрирует по градиенту хемокинов в межфолликулярное пространство, на границу с Т-зоной фолликула.

2. Второй сигнал В-клетка получает, установив контакт с Т-хелпером 2-го типа (T-helper type II, Th2) с образованием В-Т-конъюгата (B-T-conjugate). Важно, что во взаимодействие с В-клетками вступают только Th2-клетки, имевшие контакт с тем же самым антигеном, что обеспечивает специфичность их TCR (T-cell receptor) к Т-клеточному эпитопу данного антигена. Таким образом, при взаимодействии В- и Th2-клеток происходит связанное распознавание (linked recognition), в результате которого на поверхности Th2-клетки возникает молекула CD40L – рецептор CD40, экспрессируемого на мембране В-клетки. Такая дополнительная костимуляция дает толчок к началу экспрессии В-лимфоцитом рецепторов цитокинов и миграции В-Т-конъюгата в зону первичного фолликула. В-клетки, не получившие костимуляторный сигнал через CD40/CD40L, уходят в анархию или апоптоз.

3. Передача третьего сигнала реализуется посредством связывания цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-21) [1, 23], продуцируемых Th2-клеткой, с образованными на мембране В-клетки специфическими рецепторами. Кроме того, важную роль играют молекулы адгезии (ICAM), обеспечивающие продолжительный контакт В- и Th2-клеток. Под действием цитокинов В-клетка переходит в полностью активированное состояние (fully activated B cell, молекулярный фенотип IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>high</sup>), после чего совершает 6–8 делений. Одновременно с пролиферацией начинает реализовываться дифференцировочная программа, запускаемая при активации В-клеток. Завершение этой программы во многом зависит от микроокружения В-лимфоцита.

Считается, что в зависимости от типа и количества антигена, силы сигнала, поступающего от BCR, а также от его аффинности В-клетка может либо продолжить свою дифференцировку по экстрафолликулярному пути, либо мигрировать в лимфоидный фолликул.

Выбор первого пути сопровождается снижением экспрессии молекул адгезии (CXCR5) и миграцией в мягкотные шнуры. При этом В-лимфоцит начинает экспрессировать фактор Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1) – транскрипционный антагонист Bcl-6 (B-cell lymphoma 6 protein) – и дифференцируется в короткоживущую плазматическую клетку (plasma cell). В отсутствие экспрессии Blimp-1 при одновременном ослаблении экспрессии Bcl-6 В-лимфоцит дифференцируется в GC-independent В-клетку памяти (не зависящую от зародышевого центра), чаще с непременным изотипом иммуноглобулинов (unswitched B-memory cell, unswBm) [1].

Второй путь развития, наоборот, сопровождается повышением экспрессии CXCR5, попаданием В-клетки в лимфоидный фолликул и образованием зародышевого центра. Одновременно в В-лимфоците усиливается экспрессия Bcl-6, и он дает начало В-клетке герминативного центра (B-GC) – центробласту (молекулярный фенотип IgD<sup>low</sup>CD38<sup>high</sup>). Центробласты, находящиеся в так называемой темной зоне зародышевого центра, вступают в фазу быстрого деления, в ходе которого

в V-генах происходят соматические гипермутации, и превращаются в centroциты. Centroциты перемещаются в светлую зону зародышевого центра, где им предстоит пройти антиген-зависимую селекцию. В результате гипермутационного процесса образовавшиеся В-клетки несут множество вариантов исходного иммуноглобулинового рецептора (высоко-, низко- и даже аутоспецифичные), поэтому возникает необходимость отбора В-клеточных клонов, несущих наиболее высокоаффинные BCR. Антиген-зависимая селекция осуществляется при помощи фолликулярных дендритных клеток, на отростках которых в течение многих лет сохраняются чужеродные антигенные детерминанты в составе иммунных комплексов. Centroциты, не распознавшие антиген, подвергаются апоптозу, тогда как связывание антигена является сигналом к выживанию (благодаря интенсивной экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2). Таким образом, аутореактивные centroциты, как правило, лишены возможности дифференцировки в GC и в норме отсутствуют в компартментах клеток памяти и плазматических клеток.

Дополнительный сигнал, поддерживающий жизнеспособность В-клетки, возникает после взаимодействия с фолликулярными Т-хелперами (T<sub>fh</sub>) при условии предварительного связывания В-клеткой антигена и презентации его фрагмента Т-клетке. Под действием цитокинов, вырабатываемых T<sub>fh</sub> (преимущественно интерлейкина-21), выжившие centroциты вступают в процесс переключения классов иммуноглобулинов, состоящий в ряде разрезаний и соединений ДНК в С-генах тяжелых цепей иммуноглобулинов (constant gene region) и ведущий к экспрессии иммуноглобулинов классов G, E и A. Выбор С-гена конкретной тяжелой цепи происходит под влиянием эпигенетических факторов, регулируемых цитокинами [24]. В исследовании [25] показано, что при контакте В-клеток с T<sub>fh</sub>, секретирующими ИЛ-4, первые переключали изотип синтезируемых антител на IgG1 и IgE, а взаимодействие В-лимфоцитов с T<sub>fh</sub>, секретирующими преимущественно ИФН- $\gamma$ , вело к началу экспрессии IgG2. Однако так как и те и другие изменения в ДНК иммуноглобулинов не затрагивают V-гены, антигенная специфичность В-клетки остается неизменной.

В зависимости от сигналов, поступающих от T<sub>fh</sub>-клеток, centroциты могут дифференцироваться либо в GC-derived В-клетки памяти с переключенным изотипом иммуноглобулинов (switched В-memory cell, swBm), либо в плазмабласты (под действием цитокинов ИЛ-2, ИЛ-10) [24]. Плазмабласты (молекулярный фенотип IgD<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) затем дают начало долгоживущим плазматическим клеткам, покидая при этом фолликул и поступая в кровотоки, либо вновь мигрируют в темную зону для прохождения второго круга соматического гипермутагенеза. Благодаря нескольким раундам соматического гипермутагенеза и антиген-зависимой селекции в оставшихся в зародышевом центре В-клетках повышается сродство BCR к антигену, тем самым происходит созревание аффинности [26].

Таким образом, в ходе первичного иммунного ответа на антиген происходит дифференцировка В-клетки в двух направлениях: в плазматические (антителообразующие) клетки и В-клетки памяти. Остановимся подробнее на каждой из этих субпопуляций.

### 3.1. Плазматические клетки

Будучи клетками, находящимися на терминальной стадии дифференцировки, плазматические клетки обладают очень низким уровнем пролиферативной активности. Зрелые плазматические клетки имеют большой размер (20 мкм и более), а также утрачивают подвижность. Вместо мембранной формы иммуноглобулина плазматические клетки секретируют свободную форму этой молекулы – антитела. При этом каждая плазматическая клетка синтезирует антитела, идентичные по характеристикам (изотип, аллотип, идиотип, специфичность) мембранным иммуноглобулинам В-клетки-предшественницы. Отмечено изменение уровня экспрессии мРНК иммуноглобулинов у плазматических клеток по сравнению с наивными и В-клетками памяти [27].

Принято считать, что молекула CD138 – основной маркер плазматических клеток, однако Fink и соавт. [28] показали наличие в периферической крови субпопуляции CD138<sup>+</sup>-плазмабластов, способных к пролиферации и экспрессии CD38 и CD27 на том же уровне, что и CD138<sup>-</sup>-плазмабласты. Это позволяет сделать вывод, что популяция циркулирующих CD138<sup>+</sup>-клеток является неоднородной и включает плазматические клетки, покинувшие лимфоидный фолликул, а также плазмабласты, входящие в терминальную стадию дифференцировки, которые в дальнейшем становятся резидентными плазматическими клетками вторичных лимфоидных органов.

Наиболее распространенная классификация разделяет плазматические клетки на короткоживущие (short lived plasma cells, SLPC) и долгоживущие (long lived plasma cells, LLPC).

Как правило, SLPC образуются в ответ на TI-антигены (часто они являются потомками В-1- и МЗВ-клеток), а также в результате дифференцировки В-2-клеток по экстрафолликулярному пути. В обоих случаях В-клетки перестают получать сигналы от Bcl-6, тормозящего их терминальную дифференцировку, не попав в зародышевые центры фолликулов. Как следствие, В-лимфоциты становятся SLPC, минуя процессы переключения изотипов иммуноглобулинов и соматического гипермутагенеза. Большинство SLPC локализуется в селезенке, региональных лимфоузлах и кишечнике. Срок жизни SLPC составляет в среднем 3–5 дней. На поверхности SLPC экспрессируется незначительное количество МНС II и IgM. Основная масса IgM секретируется SLPC в свободной форме в виде низкоаффинных антител. Мембранный фенотип SLPC: CD19<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD27<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD44<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> [29, 30]. К SLPC также иногда относят В-1-клетки, секретирующие растворимые Nabs [31].

Согласно классическим представлениям, LLPC образуются в ответ на TD-антигены и берут начало от плазмбластов зародышевых центров, прошедших соматический гипермутагенез, антиген-зависимую селекцию и переключение классов синтезируемых иммуноглобулинов. Только после завершения описанных процессов зрелая LLPC, секретирующая высокоаффинные антитела одного из переключенных классов, покидает зародышевый центр и мигрирует в костный мозг либо остается в красной пульпе селезенки или перемещается в медуллярную часть лимфоидного фолликула, где может персистировать в течение длительного времени. В экспериментах на мышах, однако, показано, что LLPC селезенки могут образовываться из Vm-клеток, имеющих как фолликулярное, так и внефолликулярное происхождение [32]. Кроме того, в исследованиях [33, 34] выявлено наличие LLPC, специфичных к капсулярному полисахариду S3 пневмококка (TI-2 антиген).

LLPC являются постоянным источником сывороточных антител различных классов, а также принимают участие во вторичном иммунном ответе, благодаря чему их называют клетками эффекторного звена иммунной памяти (effector memory cells). Срок жизни LLPC сопоставим с продолжительностью жизни человека и во многом зависит от локального микроокружения, обеспечивающего В-клетку необходимыми стромальными факторами, молекулами адгезии и хемокинами [35]. Для LLPC характерна потеря чувствительности к анти-В-клеточной терапии ввиду утраты специфических для В-клеток мембранных молекул – иммуноглобулинов и других компонентов BCR, молекул МНС, костимулирующих молекул [1]. Мембранный фенотип LLPC незначительно отличается от такового у SLPC. Главным отличием является полное отсутствие молекул МНС на поверхности LLPC.

### 3.2. В-клетки памяти

В-клетки памяти (Vm) называют центральным звеном иммунной памяти (central memory cells) за их способность дифференцироваться в SLPC или LLPC за счет комбинации сигналов (как антиген-зависимых, так и антиген-независимых) [36]. Основным сигналом, как правило, является повторное поступление специфического для этих клеток антигена. Особенность Vm состоит в том, что они не участвуют в иммунном ответе, в ходе которого они образовались (например, в первичном иммунном ответе), однако в ходе вторичного иммунного ответа их реакция оказывается более оперативной, мощной и результативной, чем ответ наивных лимфоцитов. Vm обладают особой транскрипционной программой, позволяющей им, с одной стороны, длительно существовать в организме без Т-клеточной помощи и в отсутствие антигена, вызвавшего их образование, а с другой – быстро узнавать антиген и отвечать на его повторное введение [37–39]. Локализация Vm зависит, как правило, от того, в каком месте они были продуцированы в ходе первичного иммунного ответа. Зачастую они заполняют мантийную часть лимфатического узла

либо мигрируют в общий кровоток. Кроме того, некоторое количество Vm определяется в MALT.

Морфологически Vm схожи с наивными В-клетками, однако на них экспрессировано больше костимулирующих и активационных маркеров (CD80, CD86, CD93). Для Vm-клеток человека характерно наличие маркера CD27 [40]. В то же время некоторые Vm его не экспрессируют.

На данный момент известно, что помимо классического пути, в ходе которого Vm берут начало в зародышевом центре после предварительного контакта с антигеном, существуют и альтернативные варианты формирования Vm вне зародышевых центров и даже в ответ на Т-независимые антигены. В исследованиях на мышах было показано, что развитие Vm вне зародышевых центров регулируется отдельной субпопуляцией Т-хелперных клеток (не-Tfh) [41]. Помимо различий в происхождении, Vm также отличаются уровнями экспрессии поверхностных маркеров CD38, CD21, CD24, CD19, CD25 и CD45, а также другими характеристиками (вклад в развитие аутоиммунных заболеваний, время жизни, скорость и количество делений в экспериментах *in vivo* и т.д.). Существуют две наиболее распространенные классификации Vm, основанные на мембранных маркерах, наиболее часто используемых в цитометрии.

Первая классификация – Vm1-Vm5 – считается хронологической, так как отражает молекулярный фенотип Vm на различных стадиях дифференцировки, начиная от зрелого наивного В-лимфоцита. Vm1-Vm5-классификация основывается на поверхностной экспрессии IgD и CD38 (табл. 3). Данная классификация, однако, обладает рядом существенных недостатков. Например, субпопуляции Vm1 и Vm2 могут включать как В-клетки с переключенными, так и с непереключенными изотипами экспрессируемых иммуноглобулинов, а Vm2<sup>+</sup>-субпопуляция может содержать транзиторные В-клетки.

Согласно второй классификации, в основе которой лежит экспрессия Vm IgD и CD27, выделяют следующие субпопуляции:

1. В-клетки памяти с непереключенным изотипом иммуноглобулинов (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup>). Клетки данной субпопуляции образуются из В-клеток, дифференцирующихся по экстрафолликулярному пути (также к их предшественникам относят и MZB-клетки), и следовательно, не проходят через селекцию, переключение классов Ig и созревание аффинности. Многие unswVm способны экспрессировать IgM. Считается, что такие IgM<sup>+</sup>-unswVm образуются в ходе Т-независимого иммунного ответа на TI-2-антигены.

2. В-клетки памяти с переключенным изотипом иммуноглобулинов (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>) берут начало от плазмбластов в зародышевых центрах, для них характерно переключение классов Ig и наличие множественных соматических мутаций в V-генах Ig. Также swVm являются продуцентами плазмбластов при повторной инфекции. Так в исследовании [28] показано, что активированные плазмбласты (CD19<sup>low</sup>CD20<sup>+</sup>)

**Таблица 3.** Vm1-Vm5-классификация В-клеток памяти человека

Мембранный фенотип		Субпопуляция		Стадия дифференцировки В-лимфоцита	
IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>		Vm1		Зрелая наивная В-клетка	
IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>		Vm2		Активированная наивная В-клетка	
IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>++</sup>		Vm2 <sup>+</sup>		Предшественница GC-В-клетки	
IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>++</sup>		Vm3		Центробласт	
		Vm4		Центроцит	
IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>+/-</sup>		Vm5		В-клетка памяти	
CD38 <sup>+</sup>	CD38 <sup>-</sup>	early Vm5	late Vm5	Ранняя	Поздняя

CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>CD138<sup>+/-</sup>), появляющиеся в крови на 6-7-й день после инфекции/вакцинации, являются потомками В-клеток памяти, прошедших переключение изотипов Ig и соматический гипермутационез. Возможно, биологический смысл существования swVM и unswVM заключается в том, что первые, как наиболее специфичные, необходимы для борьбы с инфекцией при повторном заражении конкретным видом возбудителя, тогда как вторые служат для обеспечения перекрестного связывания родственных видов патогенов [42].

3. Двойные негативные В-клетки памяти (double negative B-memory cells, DN) составляют около 5% от всех В-клеток периферической крови и характеризуются как CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>-клетки. Данная субпопуляция является наиболее малоизученной и достаточно гетерогенной. В нее могут входить как IgM<sup>+</sup>-, так и IgG<sup>+</sup>/IgA<sup>+</sup>-Vm. Предполагается, что DN являются потомками CD27<sup>+</sup>-Vm. Отличительная особенность этой субпопуляции – ослабленная способность дифференцироваться в плазматические клетки [36].

### 3.3. Регуляторные В-клетки

Выделение субпопуляции регуляторных В-клеток (B regulatory cell, Breg) произошло относительно недавно. Впервые термин был применен при описании вырабатывающих ИЛ-10 В-клеток, способных уменьшать клинические проявления ЭАЭ (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит) [43].

На данный момент не выявлен специфический транскрипционный фактор, отвечающий за дифференцировку Breg. Точное происхождение Breg остается неизвестным, до сих пор среди исследователей нет единого мнения о том, всегда ли субпопуляция Breg присутствует в организме или ее развитие индуцируется сигналами извне. Однако экспериментально установлено, что Breg способны развиваться под действием факторов, определяемых клеточным микроокружением (активация через CD40, стимуляция липополисахаридами и CpG через TLR4 и TLR9, действие ИЛ-5, ИЛ-4). На сегодняшний день господствует предположение о том, что Breg могут дифференцироваться из любых В-клеток (незрелые и зрелые В-клетки, плазмобласты, Vm, плазматические клетки и др.). В пользу данной гипотезы говорит существующее фенотипическое разнообразие Breg, выделенных при различных аутоиммунных заболеваниях. Тот факт, что Breg локализуются не только в селезенке, но и в регио-

нальных лимфоузлах, также указывает на возможность происхождения Breg от различных предшественников. Согласно многочисленным исследованиям, развитию Breg способствуют клеточные сигналы, возникающие в ходе воспалительных реакций.

Показана положительная роль Breg в противодействии аутоиммунным патологиям за счет проявления выраженных иммуносупрессивных функций. Реализация последних осуществляется посредством секреции ИЛ-10, угнетающего выработку провоспалительных цитокинов моноцитами и дендритными клетками, а также блокирующего костимуляцию Т-клеток через CD28. Кроме того, Breg способны модулировать клеточный иммунный ответ через секретируемые ими другие противовоспалительные цитокины (ИЛ-1β, ИЛ-35, ИЛ-21, ТФРβ): влиять на дифференцировку Т-клеток, смещая ее в сторону регуляторного фенотипа, поддерживать функционирование iNKT, ингибировать дифференцировку Tfh, Th1 и Th17. Существует предположение, что аутореактивные В-клетки под влиянием внешних стимулов способны менять свой фенотип, превращаясь в Breg, которые, в свою очередь, элиминируют остальные аутореактивные клоны.

Ряд работ указывает на существование популяции киллерных Breg (FasL<sup>+</sup>IL5RA<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>), экспрессирующих на поверхности Fas-лиганд, вызывающий апоптоз активированных CD4<sup>+</sup>-Т-клеток. Также показано участие киллерных Breg в иммунном ответе против некоторых бактериальных и паразитарных инфекций. Интересно, что присутствие популяции традиционных Breg после заражения бактериальными и вирусными инфекциями, наоборот, отягощало течение заболевания и ассоциировалось с дисфункцией полноценного иммунного ответа. Многие исследования демонстрируют связь между присутствием Breg и развитием опухолевых заболеваний [44].

Суммируя накопленные к настоящему моменту знания о Breg, можно заключить, что функционирование данной субпопуляции лимфоцитов должно строго контролироваться организмом, начиная с восприятия ими провоспалительных сигналов в своем микроокружении и заканчивая жестким контролем их дифференцировки и развития.

### Заключение

В-лимфоциты традиционно считают одним из центральных элементов гуморального иммунитета. Однако

их функции не ограничиваются секрецией антител. В-клетки способны принимать участие в клеточном иммунитете, выступая как АПК и оказывая костимулирующее действие на Т-лимфоциты. Кроме того, В-клетки продуцируют различные цитокины, тем самым участвуя в воспалительных процессах и противомикробных за-

щитных механизмах. И наконец В-лимфоциты могут действовать как регуляторные клетки, которые управляют как клеточным, так и гуморальным звеном иммунного ответа. Многообразие их функций обусловлено существованием разных субпопуляций, осуществляющих перечисленные задачи.

## ■ Литература

1. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.
2. Бурместер Г.Р., Пецутто А., Улирикс Т., Айхер А. Наглядная иммунология. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009.
3. Sanyal M., Fernandez R., Levy S. Enhanced B cell activation in the absence of CD81. *International Immunology*. 2009; 21 (11): 1225–37. doi:10.1093/intimm/dxp090
4. Allman D., Lindsley R.C., DeMuth W., Rudd K., Shinton S.A., Hardy R.R. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol.* 2001; 167 (12): 6834–40. doi:10.4049/jimmunol.167.12.6834
5. Hardy R.R., Hayakawa, K. B cell development pathways. *Annual Review of Immunology*. 2001; 19 (1): 595–621. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.595
6. Yarkoni Y., Getahun A., Cambier J.C. Molecular underpinning of B-cell anergy. *Immunol. Rev.* 2010; 237 (1): 249–63. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00936.x
7. Cambier J.C., Stephen B.G., Barbara J.V. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7 (8): 633–43. doi:10.1016/j.imlet.2009.09.006
8. Kaminski D.A., Wei C., Qian Y., Rosenberg A.F., Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front. Immunol.* 2012; 3: 302. doi:10.3389/fimmu.2012.00302
9. Будкова А.И., Лапин С.В., Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Тришина И.Н., Маслянский А.Л., и др. Субпопуляционный состав В-клеток периферической крови у больных системной красной волчанкой. *Медицинская иммунология*. 2017; 19 (2): 175–84. doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184
10. Vale A.M., Kearney J.F., Nobrega A., Schroeder H.W. Chapter 7—Development and function of B cell subsets. In: Alt F.W., Honjo T., Radbruch A., Reth M., ed. *Molecular Biology of B Cells*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-397933-9.00007-2
11. Сизякина Л.П., Харитоновна М.В. Характеристика В2-лимфоцитов у пациентов с серонегативным ревматоидным артритом суставной формы. *Иммунология*. 2018; 39 (2–3): 134–6.
12. Dono M., Cerruti G., Zupo S. The CD5<sup>+</sup> B-cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36 (11): 2105–11.
13. Covens K., Verbinnen B., Geukens N., Meyts I., Schuit F., Lommel V.L., et al. Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. *Blood*. 2013; 121 (26): 5176–83. doi: 10.1182/blood-2012-12-471953.
14. Griffin D.O., Holodick N.E., Rothstein T.L. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup>. *J. Exp. Med.* 2011; 208 (1): 67–80. doi: 10.1084/jem.20101499
15. Duan B., Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2006; 5 (6): 403–8. doi: 10.1016/j.autrev.2005.10.007
16. Holstein S.A., Avet-Loiseau H., Hahn T., et al. BMT CTN Myeloma Intergroup Workshop on Minimal Residual Disease and Immune Profiling: Summary and Recommendations from the Organizing Committee. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2018; 24 (4): 641–8. doi:10.1016/j.bbmt.2017.12.774
17. Pillai S., Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9 (11): 767–77. doi: 10.1038/nri2656
18. Allan L.L., Stax A.M., Zheng D-J, Chung B.K., Kozak F.K., Tan R., et al. CD1d and CD1c expression in human B cells is regulated by activation and retinoic acid receptor signaling. *J. Immunol.* 2011; 186 (9): 5261–72. doi: 10.4049/jimmunol.1003615
19. Amlot P.L., Grennan D., Humphrey J.H. Splenic dependence of the antibody response to thymus-independent (TI-2) antigens. *Eur. J. Immunol.* 1985; 15 (5): 508–12. doi: 10.1002/eji.1830150516
20. Sen G., Wu H.-J., Bikah G., Venkataraman C., Robertson D.A., Snow E.C., et al. Defective CD19-dependent signaling in B-1a and B-1b B lymphocyte subpopulations. *Mol. Immunol.* 2002; 39 (1–2): 57–68.
21. Marasco W., Avnir Y. Immunogenetic restriction on elicitation of antibodies. Patent US N 20170174751A1; 2017.
22. Mak T.W., Saunders M.E., Jett B.D. *Primer to the Immune Response*: Second Edition. London: Elsevier Inc., 2014.
23. Топтыгина А.П. Общие закономерности формирования и поддержания специфического гуморального иммунного ответа на примере ответа на вирусы кори и краснухи. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4 (1): 7–14.
24. Гариб Ф.Ю. В-лимфоциты и моноклональные лечебные антитела. Лекция. *Вестник лимфологии*. 2009; 2: 29–38.
25. Poholek A., Craft J. Competing for help: new insights into the function of follicular helper T cells. *Immunol. Cell Biol.* 2009; 87: 438–9.
26. Duchamp M. B-cell subpopulations in children: national reference values. *Immunity, Inflammation and Disease*. 2014; 11: 131–40. <https://doi.org/10.1002/iid3.26>
27. Лебедин М.Ю., Турчанинова М.А., Егоров Е.С., Британова О.В., Чудаков Д.М. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования репертуаров антител с использованием уникальных молекулярных идентификаторов. *Иммунология*. 2017; 38 (1): 59–63.
28. Fink K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Front. Immunol.* 2012; 3: 78. doi: 10.3389/fimmu.2012.00078
29. Anolik J.H., Looney R.J., Lund F.E., Randall T.D., Sanz I. Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. *Immunol. Res.* 2009; 45 (2–3): 144–58. doi: 10.1007/s12026-009-8096-7
30. Rajewsky K. The Cellular Basis of B Cell Memory. Chapter 16—Development and function of B cell subsets. In: Alt F.W., Honjo T., Radbruch A., Reth M., ed. *Molecular Biology of B Cells*. London: Academic Press, 2004.
31. Malkiel S., Barlev A.N., Atisha-Fregoso Y., Suurmond Y., Diamond B. Plasma Cell Differentiation Pathways in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* 2018; 9: 427. doi: 10.3389/fimmu.2018.00427
32. DiLillo D.J., Hamaguchi Y., Ueda Y., Yang K., Uchida J., Haas K.M., et al. Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Immunol.* 2008; 180 (1): 361–71. doi:10.4049/jimmunol.180.1.361
33. Ferraro A.J., Drayson M.T., Savage C.O., MacLennan I.C. Levels of autoantibodies, unlike antibodies to all extrinsic antigen groups, fall following B cell depletion with Rituximab. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38: 292–8. doi:10.1002/eji.200737557
34. VandeVeerdonk F.L., Lauwerys B., Marijnissen R.J., Timmermans K., di Padova F. The anti-CD20 antibody rituximab reduces the Th17 cell response. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 1507–16. doi:10.1002/art.30314
35. Chu V.T., Beller A., Nguyen T.T.N., Steinhilber G., Berek C. The long-term survival of plasma cells. *Scand. J. Immunol.* 2011; 73 (6): 508–11. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02544.x
36. Sanz I., Wei C., F. Lee E-H., Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin. Immunol.* 2008; 20 (1): 67–82. doi: 10.1016/j.smim.2007.12.006
37. Anderson S.M., Hannum L.G., Shlomchik M.J. Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. *J. Immunol.* 2006; 176: 4515–9. doi:10.1073/pnas.0800555105
38. Maruyama M., Lam K.R., Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature*. 2000; 407: 636–42. doi:10.1038/35036600
39. Ochsenbein A.F., Penschew D.D., Sierro S., Horvath E., Hengartner H., Zinkernagel R.M. T-independent type II immune responses generate memory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97: 13263–8. doi:10.1084/jem.20052036
40. Agematsu K. Memory B cells and CD27. *Histol. Histopathol.* 2000; 15: 573–6. doi:10.14670/HH-15.573

41. Bergmann B., Grimsholm O., Thorarindottir K., Ren W., Jirholt P., Gjertsson I., et al. Memory B cells in mouse models. *Scand. J. Immunol.* 2013; 78 (2): 149–56. doi:10.1111/sji.12073

42. Pape K.A., Taylor J.J., Maul R.W., Gearhart P.J., Jenkins M.K. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science.* 2011; 331 (6021): 1203–7. doi:10.1126/science.1201730

## ■ References

1. Yarilin A.A. *Immunology.* Moscow: GEOTAR-Media, 2010. (in Russian)

2. Burmester G.R., Petsutto A., Ulrikhs T., Aykher A. *Visual immunology.* Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy, 2009. (in Russian)

3. Sanyal M., Fernandez R., Levy S. Enhanced B cell activation in the absence of CD81. *International Immunology.* 2009; 21 (11): 1225–37. doi:10.1093/intimm/dxp090

4. Allman D., Lindsley R.C., DeMuth W., Rudd K., Shinton S.A., Hardy R.R. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol.* 2001; 167 (12): 6834–40. doi:10.4049/jimmunol.167.12.6834

5. Hardy R.R., Hayakawa, K. B cell development pathways. *Annual Review of Immunology.* 2001; 19 (1): 595–621. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.595

6. Yarkoni Y., Getahun A., Cambier J.C. Molecular underpinning of B-cell anergy. *Immunol. Rev.* 2010; 237 (1): 249–63. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00936.x

7. Cambier J.C., Stephen B.G., Barbara J.V. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7 (8): 633–43. doi:10.1016/j.imlet.2009.09.006

8. Kaminski D.A., Wei C., Qian Y., Rosenberg A.F., Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front. Immunol.* 2012; 3: 302. doi:10.3389/fimmu.2012.00302

9. Budkova A.I., Lapin S.V., Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Trishina I.N., Maslyansky A.L., et al. B-cell subpopulations of peripheral blood in systemic lupus erythematosus. *Meditinskaya immunologiya.* 2017; 19 (2): 175–84. doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184. (in Russian)

10. Vale A.M., Kearney J.F., Nobrega A., Schroeder H.W. Chapter 7—Development and function of B cell subsets. In: Alt F.W., Honjo T., Radbruch A., Reth M., ed. *Molecular Biology of B Cells.* 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-397933-9.00007-2

11. Sizyakina L.P., Haritonova M.V. Characterization of B2 lymphocytes in patients with articular seronegative rheumatoid arthritis. *Immunologiya.* 2018; 39 (2–3), 134–6. (in Russian)

12. Dono M., Cerruti G., Zupo S. The CD5<sup>+</sup> B-cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36 (11): 2105–11.

13. Covens K., Verbinen B., Geukens N., Meyts I., Schuit F., Lommel V.L., et al. Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. *Blood.* 2013; 121 (26): 5176–83. doi: 10.1182/blood-2012-12-471953.

14. Griffin D.O., Holodick N.E., Rothstein T.L. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD70<sup>-</sup>. *J. Exp. Med.* 2011; 208 (1): 67–80. doi: 10.1084/jem.20101499

15. Duan B., Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2006; 5 (6): 403–8. doi: 10.1016/j.autrev.2005.10.007

16. Holstein S.A., Avet-Loiseau H., Hahn T., et al. BMT CTN Myeloma Intergroup Workshop on Minimal Residual Disease and Immune Profiling: Summary and Recommendations from the Organizing Committee. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2018; 24 (4): 641–8. doi:10.1016/j.bbmt.2017.12.774

17. Pillai S., Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9 (11): 767–77. doi: 10.1038/nri2656

18. Allan L.L., Stax A.M., Zheng D-J, Chung B.K., Kozak F.K., Tan R., et al. CD1d and CD1c expression in human B cells is regulated by activation and retinoic acid receptor signaling. *J. Immunol.* 2011; 186 (9): 5261–72. doi: 10.4049/jimmunol.1003615

19. Amlot P.L., Grennan D., Humphrey J.H. Splenic dependence of the antibody response to thymus-independent (TI-2) antigens. *Eur. J. Immunol.* 1985; 15 (5): 508–12. doi: 10.1002/eji.1830150516

20. Sen G., Wu H.-J., Bikah G., Venkataraman C., Robertson D.A., Snow E.C., et al. Defective CD19-dependent signaling in B-1a and

43. Соколов А.В. В-клеточное звено в регуляции аутоиммунных заболеваний. *Acta Naturae.* 2018; 10 N3 (38): 11–23.

44. Moore K.D., Loxton A.G. Regulatory B lymphocytes: development and modulation of the host immune response during disease. *Immunotherapy.* 2019; 11 (8): 691–704. doi:10.2217/imt-2018-0185

B-1b B lymphocyte subpopulations. *Mol. Immunol.* 2002; 39 (1–2): 57–68.

21. Marasco W., Avnir Y. Immunogenetic restriction on elicitation of antibodies. Patent US N 20170174751A1; 2017.

22. Mak T.W., Saunders M.E., Jett B.D. *Primer to the Immune Response: Second Edition.* London: Elsevier Inc., 2014.

23. Toptygina A.P. General patterns of the formation and maintenance of a specific humoral immune response by the example of the response to measles and rubella viruses. *Infection and immunity.* 2014; 4 (1): 7–14. (in Russian)

24. Garib F.Yu. B-lymphocytes and monoclonal therapeutic antibodies. *Lecture. Bulletin of lymphology.* 2009; 2: 29–38. (in Russian)

25. Poholek A., Craft J. Competing for help: new insights into the function of follicular helper T cells. *Immunol. Cell Biol.* 2009; 87: 438–9.

26. Duchamp M. B-cell subpopulations in children: national reference values. *Immunity, Inflammation and Disease.* 2014; 11: 131–40. https://doi.org/10.1002/iid3.26

27. Lebedin M.Yu., Turchaninova M.A., Egorov E.S., Britanova O.V., Chudakov D.M. Analysis of antibody repertoires high throughput sequencing using unique molecular identifiers. *Immunologiya.* 2017; 38 (1): 59–63. (in Russian)

28. Fink K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Front. Immunol.* 2012; 3: 78. doi: 10.3389/fimmu.2012.00078

29. Anolik J.H., Looney R.J., Lund F.E., Randall T.D., Sanz I. Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. *Immunol. Res.* 2009; 45 (2–3): 144–58. doi: 10.1007/s12026-009-8096-7

30. Rajewsky K. The Cellular Basis of B Cell Memory. Chapter 16—Development and function of B cell subsets. In: Alt F.W., Honjo T., Radbruch A., Reth M., ed. *Molecular Biology of B Cells.* London: Academic Press, 2004.

31. Malkiel S., Barlev A.N., Atisha-Fregoso Y., Suurmond Y., Diamond B. Plasma Cell Differentiation Pathways in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* 2018; 9: 427. doi: 10.3389/fimmu.2018.00427

32. DiLillo D.J., Hamaguchi Y., Ueda Y., Yang K., Uchida J., Haas K.M., et al. Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Immunol.* 2008; 180 (1): 361–71. doi:10.4049/jimmunol.180.1.361

33. Ferraro A.J., Drayton M.T., Savage C.O., MacLennan I.C. Levels of autoantibodies, unlike antibodies to all extrinsic antigen groups, fall following B cell depletion with Rituximab. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38: 292–8. doi:10.1002/eji.200737557

34. Van de Veerdonk F.L., Lauwerys B., Marijnissen R.J., Timmermans K., di Padova F. The anti-CD20 antibody rituximab reduces the Th17 cell response. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 1507–16. doi:10.1002/art.30314

35. Chu V.T., Beller A., Nguyen T.T.N., Steinhilber G., Berek C. The long-term survival of plasma cells. *Scand. J. Immunol.* 2011; 73 (6): 508–11. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02544.x

36. Sanz I., Wei C., F. Lee E-H., Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin. Immunol.* 2008; 20 (1): 67–82. doi: 10.1016/j.smim.2007.12.006

37. Anderson S.M., Hannum L.G., Shlomchik M.J. Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. *J. Immunol.* 2006; 176: 4515–9. doi:10.1073/pnas.0800555105

38. Maruyama M., Lam K.R., Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature.* 2000; 407: 636–42. doi:10.1038/35036600

39. Ochsenbein A.F., Pinschewer D.D., Sierro S., Horvath E., Hengartner H., Zinkernagel R.M. T-independent type II immune responses generate memory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 13263–8. doi:10.1084/jem.20052036

40. Agematsu K. Memory B cells and CD27. *Histol. Histopathol.* 2000; 15: 573–6. doi:10.14670/HH-15.573

41. Bergmann B., Grimsholm O., Thorarinsdottir K., Ren W., Jirholt P., Gjertsson I., et al. Memory B cells in mouse models. *Scand. J. Immunol.* 2013; 78 (2): 149–56. doi:10.1111/sji.12073

42. Pape K.A., Taylor J.J., Maul R.W., Gearhart P.J., Jenkins M.K. Different B cell populations mediate early and late memory during

an endogenous immune response. *Science.* 2011; 331 (6021): 1203–7. doi:10.1126/science.1201730

43. Sokolov A.V. B-cell link in the regulation of autoimmune diseases. *Acta Naturae.* 2018; 10 N3 (38): 11–23. (in Russian)

44. Moore K.D., Loxton A.G. Regulatory B lymphocytes: development and modulation of the host immune response during disease. *Immunotherapy.* 2019; 11 (8): 691–704. doi:10.2217/imt-2018-0185

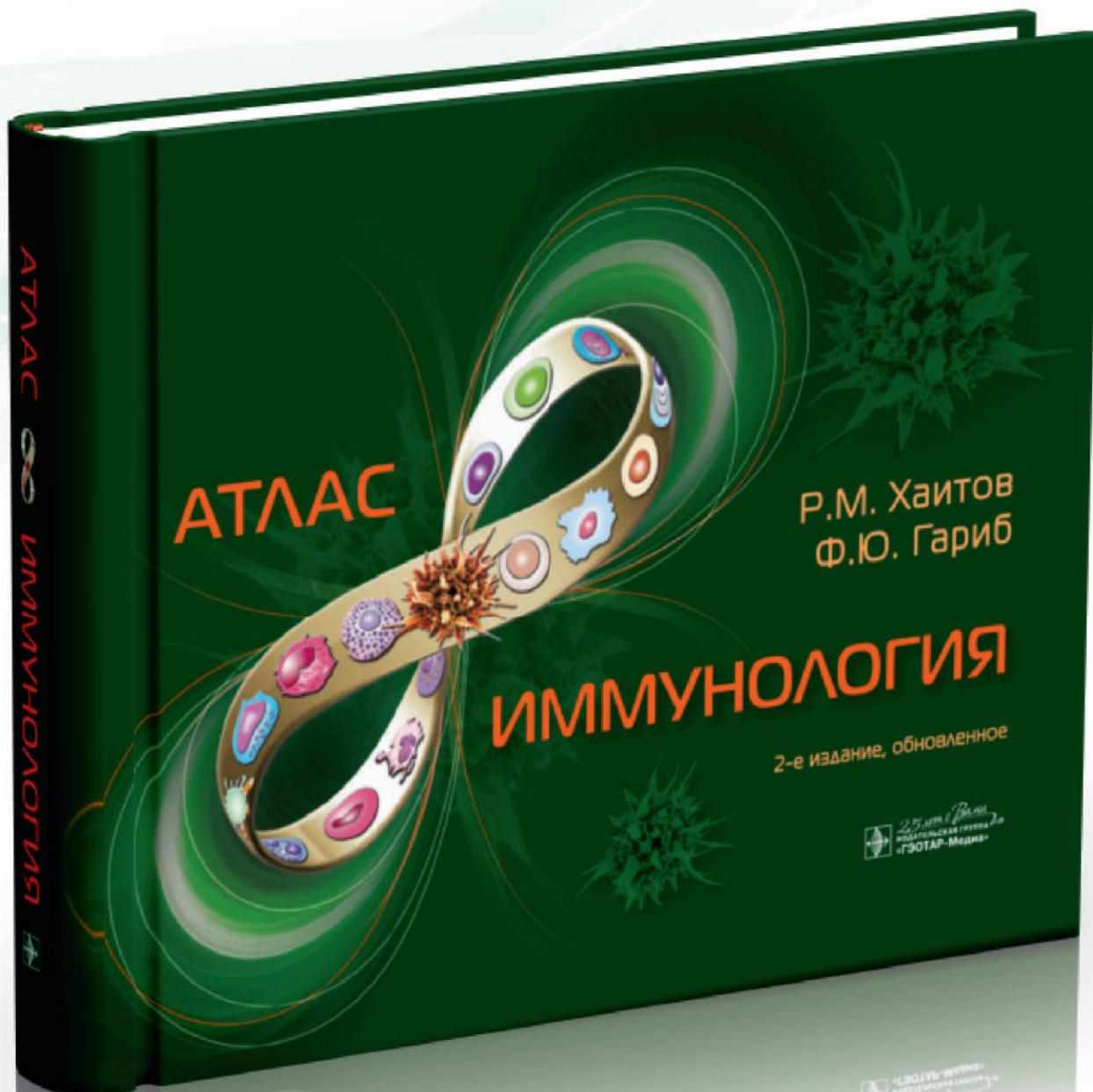
# EAACI Congress 2020

6-10 June

Bridging Innovations into  
Allergy and Asthma Prevention

Register on [eaaci.org](http://eaaci.org)





ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»

[geotar.ru](http://geotar.ru)

### Где купить книгу

[medknigaservis.ru](http://medknigaservis.ru)

Интернет-магазин «Медкнигасервис»: бесплатный номер телефона 8-800-555-999-2

#### Магазины в Москве:

**м. «Новокузнецкая», м. «Третьяковская»**  
ул. Садовническая, д. 13, стр. 11  
тел. +7 (495) 921-39-07, доб. 602, 603  
Пн. – Вс. с 9.00 – 20.00

**м. «Фрунзенская»**  
Комсомольский просп., д. 28 (подъезд 3)  
тел. +7 (916) 877-06-84  
тел. +7 (499) 685-12-47  
Пн. – Вс. с 9.00 – 20.00

**м. «Савеловская»**  
ул. Суцеский Вал, д. 9, стр. 1  
тел. +7 (985) 387-14-57  
тел. +7 (495) 921-39-07, доб. 729  
Пн. – Вс. с 9.00 – 20.00

---

## Хаитов Р.М., Гариб Ф.Ю. Иммунология. Атлас.

2-е изд., обновл. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. — 416 с.

DOI: 10.33029/9704-5525-8-IMM-2020-1-416. ISBN 978-5-9704-5525-8

Атлас является первым строго тематическим изданием по иммунологии в России и единственным за последнее десятилетие в мире. Особенность данного труда — это унификация всех 720 иллюстраций в виде схематичного изображения клеток и молекул. Книга значительно переработана, фактически создана заново. В Атласе представлена информация о важнейших достижениях современной фундаментальной и клинической иммунологии.

- Ключевые взаимосвязи между врожденным и адаптивным компонентами иммунной системы.
- Воспалительный ответ как защитный и патогенный фактор.
- Структуры молекул клеточной поверхности и секретируемых продуктов, участвующих в межклеточных взаимодействиях.
- Внутриклеточные сигнальные пути.
- Феномен трогицитоза, в процессе которого увеличивается число антиген-презентирующих дендритных клеток путем заимствования ими комплексов HLA+АГ у других дендритных клеток.
- Дефекты новых генов, приводящих к развитию первичных иммунодефицитов.
- Новые субпопуляции лимфоцитов — врожденных и Т-клеток: натуральные хелперы (NH) и ILC, натуральные киллеры Т-типа (NKT), фолликулярные хелперы (Tfh).
- Т-регуляторные клетки (Treg).
- Ранние «эмигранты» из числа Т- и В-лимфоцитов, содержащих неиспользованный генетический материал в виде экзистивных колец.
- Механизмы ауто толерантности, предотвращающие иммунопатологию.
- Патогенные свойства клеток иммунной памяти.
- Феномен иммунной эвазии патогенов, регулирующих иммунные реакции.
- Создание диагностикумов и вакцин на основе молекулярных аллергенов.
- Аутоиммунные реакции, направленные против ключевых цитокинов.
- Новые подходы к лечению рака и аутоиммунных заболеваний на основе использования моноклональных антител и Т-клеток с химерными рецепторами.
- Дизайн современных, в том числе плазмидных и рекомбинантных, вакцин и др.

Многолетний опыт научной и педагогической работы авторов привнес в стиль изложения ясность и достаточную глубину, благодаря чему иллюстрации высокого качества и лаконичные текстовые пояснения к ним будут востребованы преподавателями иммунологии для подготовки лекций и практических занятий. Предлагаемая книга будет весьма полезна не только иммунологам и аллергологам, но и врачам других профилей, поскольку большая часть заболеваний человека имеет иммунные механизмы патогенеза.

Атлас станет настольной книгой для врачей, студентов, аспирантов, научных работников, а также окажется полезным и памятным подарком для коллег.

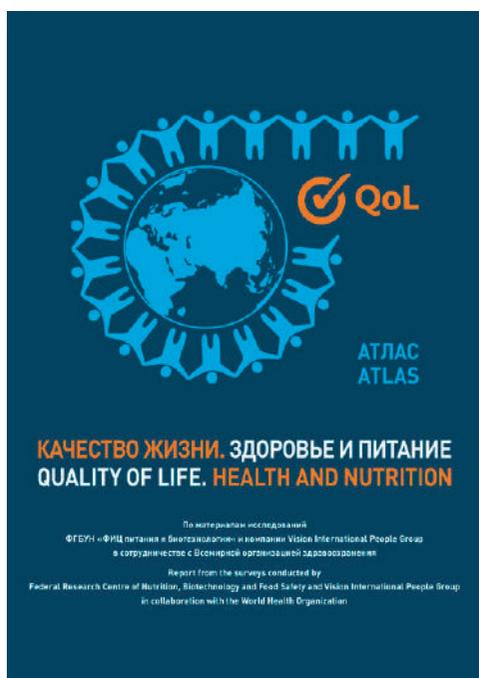
---

# КАЧЕСТВО ЖИЗНИ ЗДОРОВЬЕ И ПИТАНИЕ

АТЛАС НА РУССКОМ И АНГЛИЙСКОМ ЯЗЫКАХ

## QUALITY OF LIFE HEALTH AND NUTRITION ATLAS IN RUSSIAN AND ENGLISH LANGUAGES

Тутельян В.А., Никитюк Д.Б., Буряк Д.А., Акользина С.Е., Батурин А.К., Погожева А.В., Камбаров А.О.,  
Кишко О.Н., Абалина А.Л., Слободянина М.С.  
Пер. на англ. О.Н. Кишко



ISBN 978-5-225-10039-1

Год: 2018

Кол-во страниц: 696

Переплет: твердый

**Н**астоящее русско-английское издание является первым графическим путеводителем по качеству жизни населения России. Более 170 графиков наглядно демонстрируют российский стандарт качества жизни в разрезе различных социально-демографических характеристик и в сравнении с показателями качества жизни других стран.

Параметры качества жизни населения России представлены в атласе во взаимосвязи с показателями функционирования и здоровья, а также оценкой фактического питания. Качество жизни, здоровье и питание изучено с использованием методики Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и в сотрудничестве с ВОЗ.

Наряду с результатами исследования в атласе демонстрируется работа интернет-портала, с помощью которого проводится сбор данных. Каждый пользователь сайта может неоднократно (бесплатно и анонимно) пройти исследование, увидеть в интерактивном режиме свои результаты по качеству жизни, здоровью и питанию и изучить их динамику.

Книга будет интересна организаторам здравоохранения, специалистам по вопросам питания, медицинским работникам, социологам, экономистам, а также широкому кругу читателей.

This Russian-English publication is the first graphical guide to the quality of life in Russia. More than 170 graphs clearly demonstrate the Russian standard of quality of life in the context of various socio-demographic characteristics and in comparison with the indicators of quality of life in other countries.

Parameters of the quality of life of the Russian population are presented in the atlas in conjunction with the health and functioning indicators, as well as the assessment of actual nutrition. The quality of life, health and nutrition is studied using the methodology of the World Health Organization (WHO) and in cooperation with WHO.

Along with the results of the study, the atlas demonstrates the work of the Internet website, through which data collection is carried out. Each user of the website can repeatedly (free of charge and anonymously) go through the research, see the results on quality of life, health and nutrition in interactive mode and study their dynamics.

The book will be of interest to health care organizers, nutrition specialists, medical professionals, sociologists, economists, as well as a wide range of readers.

### Где купить книгу

Интернет-магазин «Медкнигасервис»: [www.medknigaservis.ru](http://www.medknigaservis.ru), телефон 8-800-555-999-2

#### Магазины в Москве:

**м. «Новокузнецкая», м. «Третьяковская»**  
г. Москва, ул. Садовническая, д. 13, стр. 11.  
тел. +7 (495) 921-39-07, доб. 602, 603  
Пн. – Вс. с 9.00 – 20.00

**м. «Фрунзенская»**  
г. Москва, Комсомольский просп., д. 28  
тел. +7 (916) 877-06-84  
тел. +7 (499) 685-12-47  
Пн. – Вс. с 9.00 – 20.00

**м. «Савеловская»,**  
ул. Сушевский Вал, д. 9, стр. 1  
тел. +7 (985) 387-14-57  
тел. +7 (495) 921-39-07, доб. 729  
Пн. – Вс. с 9.00 – 20.00

VIII МЕЖДУНАРОДНЫЙ  
КОНГРЕСС

2020

25–26 мая



# ОРГЗДРАВ

ЭФФЕКТИВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

**ГЛАВНАЯ ТЕМА** Стратегия развития здравоохранения РФ на период до 2025 г.: приоритеты и механизмы реализации

## КЛЮЧЕВЫЕ ТЕМЫ ПРОГРАММЫ

- Наука и искусство стратегического управления: российский и международный опыт
- Эффективное первичное звено здравоохранения: модели организации
- Система всеобщего лекарственного обеспечения: пилоты в регионах и опыт зарубежных коллег
- Управление, информатизация, документооборот: этапы единого процесса
- Мастер-классы по лидерству и эффективному управлению в здравоохранении

Ежегодно более 600 руководителей  
здравоохранения на одной площадке

Место проведения  
Москва, гостиница «Рэдиссон Славянская»

Онлайн-регистрация участников  
[www.vshouz.ru](http://www.vshouz.ru)

