

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



И.И. Мечников

Том 41
2020

2

Volume 41, Number 2, 2020

ИММУНОЛОГИЯ

Научно-практический рецензируемый журнал

Основан в 1980 г.

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий,
рекомендованных Министерством науки и высшего образования 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

Хаитов Р.М., академик РАН, доктор мед. наук, профессор

(главный редактор) (Москва, Россия)

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 (Падуа, Италия)

Пашенков М.В., доктор мед. наук (Москва, Россия)

Петров Р.В., академик РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Пинегин Б.В., доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Резников Ю.П., доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

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 41, № 2, 2020

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)

Сайт журнала: www.immunologiya-journal.ru

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

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

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

Подписано в печать 30.04.2020.
Тираж 3000 экземпляров.
Формат 60 × 90 1/8.
Печать офсетная. Печ. л. 12.

Отпечатано в ООО «Фотоэксперт»
115201, г. Москва, ул. Котляковская,
д. 3, стр. 13.
Заказ №

Все права защищены.

© ООО Издательская группа
«ГЭОТАР-Медиа», 2020.

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 41, N 2, 2020

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)

The website of the journal:

www.immunologiya-journal.ru

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 12 sh.
All rights reserved.

© GEOTAR-Media Publishing Group, 2020.

EDITORIAL BOARD

Khaitov Rakhim, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Editor-in-Chief)
(Moscow, Russia)

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)

Pashenkov 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

Горячие точки иммунологии

Хайтов Р.М.

Иммуномодуляторы: мифы и реальность

Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Пашенков М.В.

Эпителиальные клетки дыхательных путей как равноправные участники врожденного иммунитета и потенциальные мишени для иммуотропных средств

Врожденный иммунитет

Муругина Н.Е., Будихина А.С., Муругин В.В., Селезнева Е.М., Чкадуа Г.З., Пашенков М.В.

Роль NF- κ B в развитии синергического ответа макрофагов человека на сочетанную стимуляцию рецепторов NOD1 и TLR4 *in vitro*

Цитокины

Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Русинова Т.В., Павленко В.Н., Тараканов В.А., Барова Н.К., Малиновская В.В.

Неоднозначное влияние рекомбинантного интерферона α 2b на нетрансформированный и трансформированный фенотип функционально значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов в эксперименте *in vitro*

Вакцины и вакцинация

Ковыршина А.В., Должикова И.В., Гроусова Д.М., Баясин М.В., Ботиков А.Г., Панина Л.В., Гордейчук И.В., Гуляев С.А., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Тухватулин А.И., Токарская Е.А., Симакова Я.В., Есмагамбетов И.Б., Щепляков Д.В., Евграфова И.М., Дерябин П.Г., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.

Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ

Онкоиммунология

Новиков В.В., Шумилова С.В., Новиков Д.В., Алясова А.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В.

Альтернативные варианты мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 при раке толстой кишки

Механизмы аллергических реакций

Галицкая М.А., Курбачева О.М., Шиловский И.П., Никольский А.А., Никонова А.А., Дынева М.Е., Хайтов М.Р.

Некоторые особенности воспаления у пациентов с atopической бронхиальной астмой при воздействии респираторных вирусов

Вопросы преподавания

Ганковская Л.В.

С иммунологией навсегда!

Обзоры

Полевщиков А.В., Назаров П.Г.

Иммунология белков острой фазы воспаления и работы Р.В. Петрова

Гурьянова С.В., Хайтов Р.М.

Глюкозаминилмурамилдипептид – ГМДП: воздействие на мукозальный иммунитет (к вопросу иммунотерапии и иммунопрофилактики)

Хроника

Резников Ю.П.

IX конференция «Здоровье иммунной системы. Преемственность ведения иммунокомпрометированных пациентов на этапах стационар–поликлиника»

Юбилей

Академик Рэм Викторович Петров

К 90-летию со дня рождения

Contents

Hot points of immunology

101 Khaitov R.M.

Immunomodulators: myths and reality

107 Khaitov R.M., Pinegin B.V., Pashenkov M.V.

Epithelial cells of the respiratory tract as equal participants of innate immunity and potential targets for immunotropic drugs

Innate immunity

114 Murugina N.E., Budikhina A.S., Murugin V.V., Selezneva E.M., Chkadua G.Z., Pashenkov M.V.

The role of NF- κ B in the synergistic response of human macrophages to combined stimulation of NOD1 and TLR4 receptors *in vitro*

Cytokines

124 Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Rusinova T.V., Pavlenko V.N., Tarakanov V.A., Barova N.K., Malinovskaya V.V.

Contradictory effect of recombinant interferon α 2b on the non-transformed and transformed phenotypes of functionally significant subpopulations of neutrophilic granulocytes *in vitro*

Vaccines and vaccination

135 Kovyrrshina A.V., Dolzhikova I.V., Grousova D.M., Balyasin M.V., Botikov A.G., Panina L.V., Gordeychuk I.V., Gulyaev S.A., Zubkova O.V., Ozharovskaya T.A., Popova O., Tukhvatulina A.I., Tokarskaya E.A., Simakova Ya.V., Esmagambetov I.B., Shcheplyakov D.V., Evgrafova I.M., Deryabin P.G., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L.

A heterologous virus-vectored vaccine for prevention of Middle East respiratory syndrome induces long protective immune response against MERS-CoV

Oncoimmunology

144 Novikov V.V., Shumilova S.V., Novikov D.V., Alyasova A.V., Evsegneeveva I.V., Karaulov A.V.

Alternative variants of interleukin-2 receptor alpha chain mRNA in colon cancer

Mechanisms of allergic reactions

154 Galitskaya M.A., Kurbacheva O.M., Shilovskiy I.P., Nikolsky A.A., Nikonova A.A., Dyneva M.E., Khaitov M.R.

Several features of inflammation at the patients with atopical asthma when exposed to respiratory viruses

Education

164 Gankovskaya L.V.

With immunology forever!

Reviews

167 Polevshchikov A.V., Nazarov P.G.

Immunology of acute phase proteins of inflammation and work of R.V. Petrov

174 Guryanova S.V., Khaitov R.M.

Glucosaminylmuramyl dipeptide – GM DP: effect on mucosal immunity (on the issue of immunotherapy and immunoprophylaxis)

Chronicle

184 Reznikov Yu.P.

IX conference «Immune system health. Continuity of immunocompromised patients management at the hospital–polyclinic stages»

Anniversary

191 Academician Rem Viktorovich Petrov

On the 90th anniversary of his birth

Горячие точки иммунологии

© Хаитов Р.М., 2020

Хаитов Р.М.

Иммуномодуляторы: мифы и реальность

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

В обзоре рассматриваются средства, предназначенные для избирательного воздействия на различные звенья иммунной системы с целью профилактики и лечения инфекционных и ряда неинфекционных заболеваний, с учетом современных требований доказательной медицины к лекарственным препаратам. Приведены примеры создания, разработки, производства и внедрения в практику современных иммуностимулирующих лекарственных препаратов. Обсуждаются перспективные стратегии создания и применения иммуностимулирующих лекарственных препаратов, активирующих врожденный и адаптивный иммунитет, в медицинской практике.

Ключевые слова: иммунофармакология; иммуномодуляторы; иммуностимуляторы; активаторы иммунитов; гликопептид; врожденный иммунитет; адаптивный иммунитет

Статья поступила: 12.02.2020. Принята к печати: 19.03.2020.

Для цитирования: Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность. Иммунология. 2020; 41 (2): 101–106. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-101-106

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Хаитов Рахим Мусаевич –
академик РАН,
доктор медицинских наук,
профессор,
научный руководитель
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, Москва,
Российская Федерация
E-mail: rkhitov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1829-0424>

Khaitov R.M.

Immunomodulators: myths and reality

National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

Abstract

Medicines and substances intended for selective action on various parts of the immune system in order to prevent and treat infectious and some non-infectious diseases are considered. Special attention is placed to up-to-date requirements of evidence-based medicine. Examples of creation, development, production and implementation of modern immunotropic medicines are given. Promising strategies of applying technologies for creating and using immunotropic drugs that activate innate and adaptive immunity in medical practice are discussed.

Keywords: immunopharmacology; immunomodulators; immunostimulators; immunocyte activators; glycopeptide, innate immunity; adaptive immunity

Received: 12.02.2020. Accepted: 19.03.2020.

For citation: Khaitov R.M. Immunomodulators: myths and reality. Immunologiya. 2020; 41 (2): 101–6. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-101-106 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The author declares no conflict of interests.

For correspondence
Rakhim M. Khaitov –
Academician of RAS,
MD, Professor,
Scientific Advisor of NRC
Institute of Immunology
of the FMBA of Russia, Moscow,
Russian Federation
E-mail: rkhitov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1829-0424>

Иммуномодуляторы в целом – это различные биологически активные вещества (субстанции), влияющие на иммунитет, как минимум, двояко: усиливают (повышают) функции иммунной системы (иммуностимуляторы) или подавляют (понижают) иммунный ответ (иммунодепрессанты). Существует также точка зрения,

согласно которой иммуномодуляторы – это средства, которые приводят патологически измененный иммунный ответ в физиологическую норму.

На российском рынке (и в странах ближнего зарубежья) представлены и продаются около сотни субстанций под общим наименованием «иммуномодулятор».

Итак, по порядку. Начнем с иммунодепрессантов, так как среди этой категории препаратов царит иммунофармакологический порядок. Первое поколение иммунодепрессантов отличалось весьма высокой токсичностью и слабо выраженным избирательным действием на иммунную систему, в частности на клеточно-опосредованный иммунный ответ. К таким лекарственным препаратам относятся азатиоприн, меркаптопурин, метотрексат, имуран, циклофосфамид, кортизон и др. Таким образом, эта группа препаратов представлена цитостатиками, кортикостероидами, а также сюда относятся антилимфоцитарные антитела и др. Следующие поколения иммунодепрессантов произвели революцию в области трансплантации клеток, тканей и органов. Современная трансплантология началась с применения циклоспорина, селективно действующего на Т-лимфоциты (преимущественно CD4⁺) и ингибирующего, соответственно, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИФН- γ . Стали использоваться препараты моноклональных антител.

Эпоха иммуностимуляторов началась с получением адъювантов. Прежде всего это полный и неполный адъюванты Фрейнда. Они применяются при иммунизации животных различными антигенами (особенно слабоиммуногенными) для индукции существенных или максимально больших (для производственных целей) количеств антител. Гидроксид алюминия и фосфат алюминия содержатся во многих вакцинах для повышения иммуногенности вакцинных препаратов и, соответственно, усиления эффекта вакцинации. Как правило, они являются составной частью исходно слабоиммуногенных вакцинных средств. Надо сказать, что указанные адъюванты, хотя и широко применяются в производстве вакцин, в целом слабоваты. Поэтому ряд вакцин недостаточно иммуногенен, кроме того, не удастся создать вакцины против многих так называемых непобежденных инфекций.

В этой связи следует упомянуть о группе карбоцепных полиэлектролитов-иммуностимуляторов, которые усиливают иммунный ответ при иммунизации даже очень слабыми антигенами (низко- или неиммуногенными) и обеспечивают обход генетического контроля иммунного ответа – фенотипическую коррекцию слабого иммунного реагирования, обусловленного генами иммунного ответа [1–4].

Р.В. Петров и Р.М. Хаитов создали, разработали и осуществили производство и внедрение в практику нового принципа конструирования вакцин. В результате были созданы вакцины совершенно нового типа (вакцины нового поколения) – молекулярные наноконструкции, представляющие собой высокоочищенные или синтетические (рекомбинантные, полученные химическими методами пептиды и др.) антигены инфекционных агентов, химически связанные с активатором иммунцитов [1, 5–7]. Следует подчеркнуть, что суть этого подхода состоит в химическом конъюгировании (например, через ковалентные связи) антигенов вирусов и бактерий с молекулой, активирующей врожденный и адаптивный (приобретенный) иммунитет.

Разработка вышеупомянутого принципа создания конъюгированных вакцинных макромолекул, теоретически обоснованного и экспериментально подтвержденного, в итоге многолетней работы привела к получению нового семейства гриппозных вакцин под общим названием Гриппол® [8, 9]. Вакцины семейства Гриппол® были включены в перечень вакцин для обязательной вакцинопрофилактики, в Национальный календарь профилактических прививок. Авторы работы «Конъюгированные полимер-субъединичные иммуногены и вакцины» удостоены Государственной премии Российской Федерации по науке и технике за 2001 г.

Переходим к иммуностимуляторам, которые предлагаются, продаются и распространяются у нас в стране так широко, как нигде в мире. Часто их называют иммуномодуляторами. К ним должны относиться биологически активные вещества, модулирующие, то есть изменяющие иммунный ответ в нужном направлении. Следовательно, если у данного организма наблюдается иммунное расстройство с угнетением какого-либо звена иммунной системы, иммуномодулирующее средство должно усилить (активировать) его до уровня физиологической нормы. Напротив, в случае патологического повышения показателей иммунного статуса иммуномодулирующее средство должно избирательно понижать (подавлять) это звено иммунной системы до физиологической нормы (например, при аутоиммунных заболеваниях). Хотя в арсенале иммунофармакологии есть препараты, избирательно действующие на различные звенья иммунной системы [10], которые по определению являются иммуномодуляторами, идеального иммуномодулирующего лекарственного препарата, одновременно действующего на различные патологически измененные структуры и восстанавливающего их до нормы, пока нет. В будущем, возможно, удастся создать такие универсальные молекулярные комплексы (би- или поливалентные), исключительно селективно действующие на главную иммунорегуляторную клетку («дирижер иммунологического оркестра») [11].

Мне часто задают вопросы в контексте уже рассмотренных выше иммуномодуляторов, причем не только на научных и клинических конференциях и других форумах. Очень часто спрашивают об этой группе препаратов журналисты, работники телевидения и радио, когда берут у меня интервью. Даже когда я пишу статьи о проблемах и успехах иммунологии в газеты и научно-популярные журналы, редакторы нередко задают вопрос «Что такое иммуномодуляторы и насколько важно и правильно их применять?». Поэтому, несмотря на то что настоящая статья написана для научно-практического журнала, я позволю себе немного отойти от строгого научного стиля и попытаюсь ответить на этот вопрос шире и в любимом мною научно-популярном жанре.

В последние годы я, как правило, отвечаю, что настало время спасать медицину и людей от так называемых иммуномодуляторов. Почему? Потому что под

этим названием, как уже упоминалось, предлагается и продается громадное количество различных субстанций и средств, которые в лучшем случае никак не влияют на иммунную систему и организм в целом, в худшем – оказывают вредное воздействие, например, могут индуцировать аллергические процессы, аутоиммунные и другие заболевания.

У нас в стране зарегистрированы десятки лекарственных препаратов, которые, согласно инструкции по применению, являются иммуномодуляторами (иммуностимуляторами), то есть средствами, укрепляющими иммунитет, иммунную систему. Многие из них не соответствуют требованиям доказательной медицины, предъявляемым к современным лекарственным препаратам.

Кроме того, существует огромное количество веществ, не имеющих никакого отношения к иммуностимулирующим лекарственным препаратам. Загляните в любую аптеку и вы увидите это собственными глазами. Большое количество БАДов, витаминов, настоек из трав, водорослей, ягод, плодов и т.д., и т.п. Они, конечно, хороши как пищевые добавки или адаптогены, но это не лекарственные препараты.

Зайдите в продуктовые магазины: на этикетках многих изделий, таких как молочные (особенно кисломолочные) продукты, овощи, фрукты, зелень, масла, орехи, семечки, мед и др., написано, что они укрепляют, повышают иммунитет. Я этому радуюсь, убеждаюсь, насколько популярна наша наука иммунология. Разумеется, все перечисленное – это очень полезные, необходимые для нормальной жизнедеятельности организма продукты. Но это не лекарственные иммуностимулирующие препараты.

Посмотрите в Интернете, что рекомендуют для укрепления иммунитета: все вышеупомянутое, а также воды, регулярные кратковременные голодания, приятные интимные отношения, медитации и пр.

Все перечисленное, несомненно, полезно в целом. Я считаю и постоянно пропагандирую постулат, что здоровый образ жизни способствует нормальному функционированию иммунной системы. Например, занятия спортом улучшают кровообращение, а следовательно, миграцию и циркуляцию иммунокомпетентных клеток, что способствует более эффективному иммунному надзору [1, 11]. Нельзя нормально и хорошо жить без употребления мясных, рыбных, молочных, растительных и других необходимых организму продуктов и веществ. Если в организме будет дефицит белков (без достаточного поступления пептидов синтез антител будет затруднен), углеводов, витаминов и др., разумеется, иммунная система не сможет функционировать эффективно.

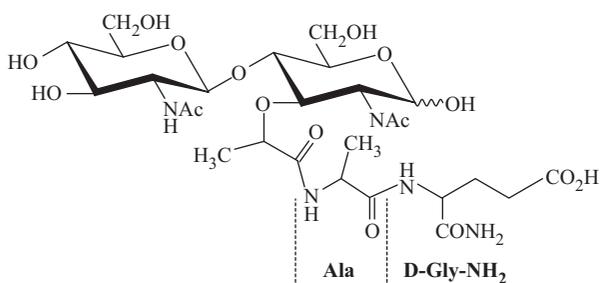
Однако все вышеперечисленное – это не иммуностимулирующие лекарственные препараты. В этой связи подчеркиваю, что термин «иммуностимулирующий» подразумевает способность биологически активных веществ избирательно воздействовать на конкретные звенья иммунитета, клетки иммунной системы [1, 9, 11, 27]. Иммуностимулирующие лекарственные препараты (иммуно-

стимуляторы и иммунодепрессанты) селективно воздействуют на иммунную систему, иммунный ответ, конкретные звенья иммунитета [1, 9, 11]. Примером совершенно неиммунотропного воздействия является, в частности, облучение всего тела ионизирующей радиацией, которое в летальных и сублетальных дозах тотально подавляет иммунитет. В последнее время находят клиническое применение методы локального использования радиации: прицельное облучение лимфатических узлов, вилочковой железы, селезенки и других лимфоидных образований или введение таргетных радиоизотопов.

Исходя из вышеизложенного обратим внимание на иммуностимулирующие препараты, усиливающие (активирующие) защитные функции иммунной системы, которые соответствуют современным требованиям к лекарственным средствам и препаратам. Важнейшее значение имеют изученность механизма действия препарата на молекулярном и клеточном уровне, наличие рецепторов к нему на/в клетках иммунной системы или воздействие на какой-либо рецептор на поверхности или внутри клетки. Здесь следует отметить пептидогликаны, практическим воплощением которых служит лекарственный препарат Иммуномакс®, который активирует рецептор TLR4 на макрофагах и дендритных клетках [10]. В иммунофармакологической литературе представлены короткие пептиды, регулирующие экспрессию генов, кодирующих синтез рецепторных белков иммунокомпетентных клеток [26]. Иммуностимулирующее действие Галавита® реализуется через активацию клеток макрофагально-моноцитарного ряда путем воздействия на аденозиновые рецепторы 1 и 2-го типов [28].

Внимание привлекает группа иммуностимулирующих средств на основе пептидогликолипидов клеточной оболочки (небольшие фрагменты) всех микробов, в частности соединения мурамилдипептидного (МДП) ряда [29, 30]. Наиболее перспективное соединение из этой группы веществ – иммуностимулирующее средство на основе глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) (см. рисунок).

Молекулы ГМДП созданы по естественным природным моделям на основе современных требований к иммуностимулирующим лекарственным средствам, тропным к конкретным клеткам иммунной системы [12]. Окончательный лекарственный препарат на основе ГМДП (Ликопид®, см. ниже) для профилактических целей может принимать любой человек в сезоны повышения ОРЗ и ОРВИ. Дело в том, что этот препарат в первую очередь активирует врожденный иммунитет [25] и практически не обладает побочным действием при приеме в профилактических целях. Лекарственные средства на основе ГМДП могут применяться и для терапии инфекционных и ряда неинфекционных болезней. В этих случаях применяется большая доза, что особенно эффективно при комбинированной терапии. На основе ГМДП, как уже упоминалось, был получен лекарственный препарат Ликопид® [12, 13, 30].



ГМДП – активная фармацевтическая субстанция (группировочное название – глюкозаминилмурамилдипептид)

Я много времени посвятил исследованию ГМДП, начиная с самых первых работ и по настоящее время, и считаю его одним из самых перспективных и поэтому в настоящей статье уделю этому направлению больше внимания.

История создания ГМДП началась в 1970-х гг., когда болгарский ученый И. Богданов обратился в Институт биоорганической химии АН СССР с предложением совместно исследовать структуры активных компонентов blastolizina, выделенного из культуры молочнокислых бактерий, который показал определенную противоопухолевую активность [14, 15]. Изучение биологических свойств blastolizina [16], определение его химической структуры [17] привело к идентификации и синтезу ряда производных МДП и в конечном итоге к получению ГМДП [18]. На основе ГМДП был создан лекарственный препарат Ликопид®. За цикл работ «Разработка и создание биотехнологического производства Ликопида – нового иммунокорректирующего лекарственного препарата» коллектив ученых в составе сотрудников Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ) и Института иммунологии ФМБА России был удостоен премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники (1996 г.). Следует отметить, что Ликопид® прошел все доклинические и клинические испытания по правилам GLP и GCP.

Вспоминаю, когда в ИБХ был создан ГМДП – Ликопид®, ко мне обратился директор ИБХ В.Т. Иванов с предложением изучить воздействие этого соединения на иммунитет. Я был директором Института иммунологии и быстро организовал все необходимые исследования при моем непосредственном участии и руководстве. Мы провели все необходимые исследования по мировым стандартам. Вначале мы обнаружили, что ГМДП активирует клетки иммунной системы *in vitro*. Затем в опытах на животных мы показали, что ГМДП усиливает иммунный ответ на различные антигены, в том числе микробные [12, 24]. Одновременно установили, что препарат нетоксичный. Требовалось ввести животным огромные дозы, чтобы зарегистрировать незначительные токсические эффекты. И наконец клинические испытания показали, что препарат

эффективен и безвреден для человека. Препарат был зарегистрирован под названием, как указано выше, Ликопид®.

В последующем разработчики препарата и производитель организовали широкие экспериментальные и клинические исследования по многим направлениям в различных научных и клинических учреждениях страны, а затем и в странах ближнего и дальнего зарубежья, в том числе в Латвии, Болгарии, Англии, Австралии [19–25].

Следует подчеркнуть, что МДП, ГМДП и окончательная лекарственная форма Ликопид® – это семейство молекул, которые представляют собой природную модель иммуностимулятора – минимальный фрагмент оболочки всех микробов. Иммунная система эволюционно подготовлена к встрече с такой молекулой – естественным адьювантом (активатором, стимулятором иммунитета).

Мы имеем дело с лекарственным препаратом, у которого детально охарактеризована химическая структура. Примечательно, что хорошо описан клеточный рецептор, с которым производные МДП, ГМДП и Ликопид® связываются при попадании в организм – цитозольный NOD2-рецептор [31–34]. Этот рецептор присутствует не только в клетках иммунной системы, но и в эпителиальных клетках слизистых оболочек, которые обладают свойствами клеток врожденного иммунитета [25, 27]. Благодаря упомянутым данным объясним эффект Ликопида при ОРЗ и ОРВИ.

Таким образом, большой интерес, возникший в России, Англии, Франции, Австралии, Японии и в других странах к иммуномодулирующим препаратам МДП-ряда, подтвержденный результатами экспериментальных и клинических исследований, в настоящее время не потерял свою актуальность. Следует еще раз подчеркнуть, что открытие специфических рецепторов к молекулам МДП-ряда, в частности ГМДП, послужило патогенетическим обоснованием их применения. Препараты упомянутого ряда широко используются для профилактики и лечения прежде всего заболеваний инфекционного генеза, а также некоторых форм злокачественных заболеваний. Перед практикующим врачом порой встает непростой вопрос о выборе иммуностропного препарата для включения в комплексную терапию пациента. В такой ситуации врач руководствуется прежде всего накопленным опытом применения препарата в клинической практике. Если говорить о зарегистрированных в нашей стране иммуномодуляторах, прежде всего, внимание привлекает Ликопид®, имеющий обширную доказательную базу и более чем 20-летний опыт успешного клинического применения. В современных условиях, когда мы все чаще встречаемся с нарастающей вирусной и бактериальной нагрузкой, наличие в арсенале практикующего врача препарата с доказанной клинической эффективностью помогает повысить уровень оказываемой пациенту помощи.

■ Литература

- Петров Р.В., Хайтов Р.М. Искусственные антигены и вакцины. Москва : Медицина, 1988. 288 с.
- Хайтов Р.М. Итоги и перспективы исследований по созданию искусственных вакцин. Иммунология. 1985; 5: 7–11.
- Petrov R.V., Khaitov R.M., Kabanov V.A. Artificial antigens and vaccines based on non natural polyelectrolytes. *Sov. Sci. Rev. J. Physicochem. Biol.* 1984; 5: 277–322.
- Petrov R. V., Khaitov R.M., Zhdanov V.M. Influenza virus antigens conjugated with a synthetic polyelectrolyte: a novel model of vaccines. *Vaccine.* 1985; 3: 392–400.
- Petrov R.V., Khaitov R.M., Semenov B.F. Artificial vaccines against salmonella infection. New approaches to vaccine development. In: Proc. Meeting. Geneva : WHO, 1983; Bell R., Torrigiani G. (eds). Basel, 1984: 390–402.
- Khaitov R.M. Vaccines based on synthetic polyions and peptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993; 685: 788–802.
- Khaitov R.M. Molecular bases for the construction of artificial immunogens and vaccines based on synthetic polyions. *Allergy Proc.* 1985; 16: 255–60.
- Петров Р.В., Хайтов Р.М. Новая отечественная тривалентная конъюгированная полимерсубъединичная вакцина «Гриппол». *Вакцинация.* 1999; 5: 6–7.
- Петров Р.В., Хайтов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011: 606 с.
- Хайтов Р.М., Атауллаханов Р.И., Шульженко А.Е. Иммуно-терапия : руководство для врачей. 2-е изд. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018: 786 с.
- Хайтов Р.М. Иммунология. 3-е изд. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018: 496 с.
- Иванов В.Т., Хайтов Р.М., Андропова Т.М., Пинегин Б.В. Липолипид (глюкозаминилмурамилдипептид) – новый отечественный высокоэффективный 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 липолипида. *Иммунология.* 1998; 18: 60–3.
- Bogdanov I.G., Dalev P.G., Gurvich A.I. et al. Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus*. *FEBS Lett.* 1975; 57: 259–61.
- Bogdanov I.G., Velichkov V.T., Gurvich A.L. Antitumor action of glycopeptide from the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. *Exp. Biol. Med.* 1978; 84: 1750–3.
- Андропова Т.М., Ростовцева Л.И., Добрушкина Е.П. О структуре противопухового гликопептида из клеточной стенки *Lactobacillus bulgaricus*. *Биоорганическая химия.* 1980; 6 (12): 1830–40.
- Ростовцева Л.И., Андропова Т.М., Малькова В.П. Синтез и противоопуховое действие гликопептидов, содержащих N-ацетилглюкозаминил-(бета1-4)-N-ацетилмурамил-дисахаридное звено. *Биоорганическая химия.* 1981; 7 (12): 1843–58.
- Andronova T.M., Ivanov V.T. The structure and immunomodulating function of glucosaminylmuramyl peptides. *Sov. Med. Rev. D. Immunol.* 1991; 4: 1–63.
19. Khaitov R.M., Kulakov A.V., Pinegin B. V., Makarov E.A. et al. The study of serum level and immunochemical properties of natural antibodies to N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl dipeptide in healthy donors. *Russ. J. Immunol.* 1996; 1 (1): 5–8.
20. Bomford R., Stapleton M., Windsor S., McKnight A. et al. The control of the antibody isotope response to recombinant human immunodeficiency virus gp120 antigen by adjuvants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1992; 8 (10): 1765–71.
21. Pinegin B.V., Kulakov A.V., Yarin D.A., Khaitov R.M. et al. Competitive analysis of specificity of natural antibodies against the epitope of bacterial cell wall peptidoglycan: glucosaminylmuramyl dipeptide carrying adjuvant activity. *Immunol. Infect. Dis.* 1996. 6 (3–4): 133–7.
22. Williamson D., Chawla M., Marks R. GMDP for psoriasis. *Lancet.* 1998; 352: 545.
23. Armstrong N.A., Bolton E.J., Morris D.L. Study of the reduction of chemotherapy induced neutropenia in mice using glucosaminylmuramyl dipeptide. *Arzneimittelforschung.* 1999; 49 (8): 716–20.
24. Хайтов Р.М. Главная мишень иммунологического действия ГМДП (Липолипида). *Иммунология.* 1994; 2: 47–50.
25. Пинегин Б.В., Хайтов Р.М. Современные принципы создания иммуностропных лекарственных препаратов. *Иммунология.* 2019; 40 (6): 57–62.
26. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological Aspects of Genomic Peptide Regulation. Basel, Switzerland : Karger AG, 2005: 104 p.
27. Хайтов Р.М., Гариб Ф.Ю. Иммунология. Атлас. 2-е изд. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2020: 416 с.
28. Донцов В.И., Подколзин А.А. Галавит – новый иммуномодулятор с биоактивирующим и регенерирующим эффектом. Ежегодник национального геронтологического центра. 2001; 4: 70–80.
29. Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974; 59 (4): 1317–25.
30. Chedid L., Audibert F., Johnson A.G. Biological activities of muramyl dipeptide, a synthetic glycopeptides analogous to bacterial immunoregulating agents. *Prog. Allergy.* 1978; 25: 63–105.
31. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M. et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (11): 8869–72.
32. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O. et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (8): 5509–12.
33. Meshcheryakova E., Makarov E., Andronova T., Ivanov V. et al. 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.
34. Strobe W., Murray P., Kitani A. et al. Signaling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 9–20.

■ References

- Petrov R.V., Khaitov R.M. Artificial antigens and vaccines. Moscow: Meditsina, 1988: 288 p. (in Russian)
- Khaitov R.M. Results and prospects of research on the creation of artificial vaccines. *Immunologiya.* 1985; 5: 7–11. (in Russian)
- Petrov R.V., Khaitov R.M., Kabanov V.A. Artificial antigens and vaccines based on non natural polyelectrolytes. *Sov. Sci. Rev. J. Physicochem. Biol.* 1984; 5: 277–322.
- Petrov R.V., Khaitov R.M., Zhdanov V.M. Influenza virus antigens conjugated with a synthetic polyelectrolyte: a novel model of vaccines. *Vaccine.* 1985; 3: 392–400.
- Petrov R.V., Khaitov R.M., Semenov B.F. Artificial vaccines against salmonella infection. New approaches to vaccine development. In: Proc. Meeting. Geneva : WHO, 1983; Bell R., Torrigiani G. (eds). Basel, 1984: 390–402.
- Khaitov R.M. Vaccines based on synthetic polyions and peptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993; 685: 788–802.
- Khaitov R.M. Molecular bases for the construction of artificial immunogens and vaccines based on synthetic polyions. *Allergy Proc.* 1985; 16: 255–60.
8. Petrov R.V., Khaitov R.M. New national trivalent conjugated polymer-subunit vaccine «Grippol». *Vaksinatziya.* 1999; 5: 6–7. (in Russian)
- Petrov R.V., Khaitov R.M. Immunogens and vaccines of new generation. Moscow: GEOTAR-Media, 2011: 606 p. (in Russian)
- Khaitov R.M., Ataullakhanov R.I., Shulzhenko A.E. Immunotherapy. A guide for physicians. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media, 2018: 786 p. (in Russian)
- Khaitov R.M. Immunology. 3rd ed. Moscow: GEOTAR-Media, 2018: 496 p. (in Russian)
- Ivanov V.T., Khaitov R.M., Andronova T.M., Pinegin B.V. Lycopid (glucosaminylmuramyl dipeptide) – a new Russian highly effective immunomodulator for the treatment and prevention of diseases associated with secondary immunological insufficiency. *Immunologiya.* 1996; 2: 4–6. (in Russian)
- Pinegin B.V., Andronova T.M. Some theoretical and practical issues of clinical application of immunomodulator Lycopid. *Immunologiya,* 1998; 18: 60–3. (in Russian)

14. Bogdanov I.G., Dalev P.G., Gurvich A.I., et al. Antitumour glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus*. *FEBS Lett.* 1975; 57: 259–61.
15. Bogdanov I.G., Velichkov V.T., Gurvich A.L. Antitumor action of glycopeptide from the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. *Exp. Biol. Med.* 1978; 84: 1750–3.
16. Andronova T.M., Rostovtseva L.I., Dobrushkina E.P. On the structure of antitumor glycopeptide from the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. *Bioorganicheskaya khimiya*. 1980; 6 (12): 1830–40. (in Russian)
17. Rostovtseva L.I., Andronova T.M., Malkova V.P. Synthesis and antitumor action of glycopeptides containing N-acetylglucosaminyl-(beta1-4)-N-acetylmuramyl-disaccharide link. *Bioorganicheskaya khimiya*. 1981; 7 (12): 1843–58. (in Russian)
18. Andronova T.M., Ivanov V.T. The structure and immunomodulating function of glucosaminylmuramyl peptides. *Sov. Med. Rev. D. Immunol.* 1991; 4: 1–63.
19. Khaitov R.M., Kulakov A.V., Pinegin B.V., Makarov E.A., et al. The study of serum level and immunochemical properties of natural antibodies to N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl dipeptide in healthy donors. *Russ. J. Immunol.* 1996; 1 (1): 5–8.
20. Bomford R., Stapleton M., Windsor S., McKnight A., et al. The control of the antibody isotope response to recombinant human immunodeficiency virus gp120 antigen by adjuvants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1992; 8 (10): 1765–71.
21. Pinegin B.V., Kulakov A.V., Yarin D.A., Khaitov R.M., et al. Competitive analysis of specificity of natural antibodies against the epitope of bacterial cell wall peptidoglycan: glucosaminylmuramyl dipeptide carrying adjuvant activity. *Immunol. Infect. Dis.* 1996; 6 (3–4): 133–7.
22. Williamson D., Chawla M., Marks R. GMDP for psoriasis. *Lancet*. 1998; 352: 545.
23. Armstrong N.A., Bolton E.J., Morris D.L. Study of the reduction of chemotherapy induced neutropenia in mice using glucosaminylmuramyl dipeptide. *Arzneimittelforschung*. 1999; 49 (8): 716–20.
24. Khaitov R.M. The main target of immunological actions of GMDP (Licopid). *Immunologiya*, 1994; 2: 47–50. (in Russian)
25. Pinegin B.V., Khaitov R.M. Modern principles of immunotropic drugs creation. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 57–62. (in Russian)
26. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. *Gerontological Aspects of Genomic Peptide Regulation*. Basel, Switzerland: Karger AG, 2005: 104 p.
27. Khaitov R.M., Garib F.Yu. *Immunology. Atlas*. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media, 2020: 416 p. (in Russian)
28. Dontsov V.I., Podkolzin A.A. Galavit – a new immunomodulator with a bioactivating and regenerating effect. *Ezhegodnik natsional'nogo gerontologicheskogo tsentra*. 2001; 4: 70–80. (in Russian)
29. Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974; 59 (4): 1317–25.
30. Chedid L., Audibert F., Johnson A.G. Biological activities of muramyl dipeptide, a synthetic glycopeptides analogous to bacterial immunoregulating agents. *Prog. Allergy*. 1978; 25: 63–105.
31. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (11): 8869–72.
32. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (8): 5509–12.
33. Meshcheryakova E., Makarov E., Andronova T., Ivanov V., et al. 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.
34. Strobe W., Murray P., Kitani A., et al. Signaling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 9–20.

© Коллектив авторов, 2020

Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Пашенков М.В.

Эпителиальные клетки дыхательных путей как равноправные участники врожденного иммунитета и потенциальные мишени для иммуотропных средств

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

В обзоре анализируется новый взгляд на эпителиальные клетки дыхательных путей как важное звено врожденного иммунитета. В связи с тем, что эпителиальные клетки слизистых оболочек респираторного тракта представляют собой первую линию защиты, препятствующую проникновению микробов во внутреннюю среду организма, представленные данные имеют важное значение в контексте борьбы с вирусными и бактериальными инфекциями путем активации эпителиальных клеток. Большое внимание уделено рецепторному аппарату и сигнальным белкам эпителиальных клеток. Анализ роли эпителиальных клеток дыхательных путей как важного компонента системы врожденного иммунитета ставит вопрос о создании и разработке подходов, позволяющих повысить функциональную активность эпителиоцитов. В заключение рассмотрена возможность использования лекарственных препаратов на основе мурамилдипептидов (МДП) и, в частности, глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), для профилактики и терапии вирусных и бактериальных инфекций дыхательного, желудочно-кишечного и урогенитального тракта.

Ключевые слова: эпителиальные клетки; врожденный иммунитет; иммуотропные средства; активация иммунитета; рецепторы; сигнальные белки

Статья поступила: 12.02.2020. Принята к печати: 19.03.2020.

Для цитирования: Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Пашенков М.В. Эпителиальные клетки дыхательных путей как равноправные участники врожденного иммунитета и потенциальные мишени для иммуотропных средств. Иммунология. 2020; 41 (2): 107–113. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-107-113

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 16-15-10314.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Хаитов Рахим Мусаевич –
академик РАН,
доктор медицинских наук,
профессор,
научный руководитель
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, Москва,
Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0003-1829-0424>

Khaitov R.M., Pinegin B.V., Pashenkov M.V.

Epithelial cells of the respiratory tract as equal participants of innate immunity and potential targets for immunotropic drugs

National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

Abstract

A new viewpoint of respiratory epithelial cells as an important part of innate immunity is considered in the review. Due to the fact that epithelial cells of the respiratory tract mucosa are the first line of defense that prevents the penetration of microbes into the internal environment of the body, the data presented are important in the context of fighting viral and bacterial infections by epithelial cells activation. Special attention is devoted to the receptors and signaling proteins of epithelial cells. The analysis of the respiratory epithelial cells' role as an important component of the innate immune response arises the question of creating and developing approaches that can increase the functional activity of epithelial cells. In conclusion,

For correspondence
Rakhim M. Khaitov –
Academician of RAS, MD, Professor,
Scientific Advisor of NRC
Institute of Immunology
of the FMBA of Russia, Moscow,
Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0003-1829-0424>

the possibility of using medicines based on muramyl dipeptides (MDP) and, in particular, GMDP, for the prevention and treatment of viral and bacterial infections of the respiratory, gastrointestinal and urogenital tracts is considered.

Keywords: epithelial cells; innate immunity; immunotropic drugs; activation of immunity; receptors; signal proteins

Received: 12.02.2020. **Accepted:** 19.03.2020.

For citation: Khaitov R.M., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. Epithelial cells of the respiratory tract as equal participants of innate immunity and potential targets for immunotropic drugs. *Immunologiya*. 2020; 41 (2): 107–13. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-107-113 (in Russian)

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant 16-15-10314.

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

Введение

Нейтрофилы, моноциты/макрофаги и другие клетки врожденного иммунитета первыми начинают борьбу с микробами, инфицирующими организм. Но фактически первой линией защиты, препятствующей проникновению микробов во внутреннюю среду организма, являются эпителиальные клетки слизистых оболочек урогенитального, желудочно-кишечного и дыхательного тракта, причем клетки респираторной системы занимают здесь лидирующее положение. Значительная часть микробов и токсинов поступает в организм человека с вдыхаемым воздухом. В силу своего анатомического расположения эпителиальные клетки дыхательного тракта первыми вступают во взаимодействие с микробами, как патогенными, так и непатогенными, и даже располагают некоторыми механизмами различия первых от вторых. Клетки же врожденного иммунитета взаимодействуют только с патогенными микробами, которые в силу наличия у них определенной степени вирулентности преодолели эпителиальный барьер и проникли во внутреннюю среду организма. Нейтрофилы, прибывшие на место их внедрения, нацелены на уничтожение этих микробов.

В настоящее время с большой степенью уверенности можно сказать, что развитие иммунитета против респираторных инфекций начинается с эпителиальных клеток слизистых оболочек дыхательных путей, состоящих из трахеи, бронхов и бронхиол. Эти клетки рассматривают как важную составную часть системы врожденного иммунитета [1, 2]. За исключением фагоцитоза, эпителиальные клетки слизистых оболочек обладают практически всеми защитными антимикробными функциями, свойственными клеткам врожденного иммунитета. В известной степени это положение можно отнести и к клеткам эндотелия сосудов, которые тоже могут вовлекаться в борьбу с инфекционными агентами. В настоящем обзоре мы хотим осветить роль эпителиальных клеток дыхательного тракта в защите организма от инфекционных агентов, как полноценных участников врожденного иммунного ответа.

Краткая информация о слизистой оболочке

Главными клетками, формирующими слизистую оболочку дыхательных путей, являются ресничные эпи-

телиоциты, составляющие до 90 % от общей численности эпителиальных клеток. Помимо ресничных клеток, важную роль в организации слизистой оболочки принимают бокаловидные клетки, синтезирующие целый набор биологически активных веществ. Практически все клетки, входящие в состав слизистой оболочки, обладают способностью синтезировать и секретировать белок муцин. В легких продуцируется более 16 типов этого белка, они обозначаются как MUC1, MUC2 и т.д. Муцин – это гидрофильный высокомолекулярный гликопротеин, обладающий антимикробными, антипротеазными и антиоксидантными свойствами [3]. Условно муцины можно разделить на мембраносвязанные и секретируемые. После синтеза некоторые типы муцина секретируются в просвет дыхательных путей, остальные остаются прочно связанными с апикальной поверхностью эпителия. Основным несекретируемым муцином является MUC1, который на поверхности слизистой оболочки создает защитный слой из слизи. Слизь обволакивает поглощенную частицу, которая благодаря координированному биению ресничек, всегда направленному в сторону глотки, выбрасывается наружу. Этот процесс называется мукоцилиарным очищением. Неспособность эпителиальных клеток к такому очищению ведет к накоплению слизи в легких. Это наблюдается при таких тяжелых заболеваниях легких, как хроническая обструктивная болезнь легких, муковисцидоз и первичная цилиарная дискинезия [4].

Рецепторный аппарат эпителиальных клеток

Так же, как и «профессиональные» клетки врожденного иммунитета – нейтрофилы и моноциты/макрофаги, эпителиальные клетки слизистой оболочки дыхательного, а также желудочно-кишечного и урогенитального тракта экспрессируют паттерн-распознающие рецепторы (pattern recognition receptors, PRRs). Эти рецепторы распознают как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), структурно консервативные компоненты, характерные для большой группы микроорганизмов, так и молекулярные структуры, возникающие в данном организме в результате мутаций или различных неблагоприятных воздействий (danger-associated molecular patterns, DAMPs). Распознавание этих паттернов в эпителиальных клетках дыхательных путей

человека осуществляют по крайней мере три группы PRRs: Толл-подобные рецепторы (TOLL-like receptors, TLRs), RIG-1-подобные рецепторы (RIG-1-like receptors, RLRs) и NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors, NLRs) [5–7].

TLRs эпителиальных клеток дыхательных путей экспрессируются на поверхности клеток и в эндосомах. Поверхностные TLR-1, -2, -4, -5, -6 распознают липопротеины, липополисахариды, белки, в том числе и жгутиковые, грибы. Эндосомальные TLR-3, -7, -8, -9 распознают вирусные одно- и двуцепочечные РНК (ssRNA и dsRNA), а также одно- и двуцепочечные ДНК (ssDNA и dsDNA). Рецептор TLR4 экспрессируется на поверхности клеток и в эндосомах. У человека выявлены 10 типов TLRs, способных распознавать практически все виды бактерий, грибов и вирусов и, соответственно, их PAMPs. На основе структурной гомологии к семейству TLRs относят рецепторы интерлейкина (ИЛ)-1 (IL-1Rs) [5, 6, 8, 9].

Кроме поверхностных TLRs, эпителиальные клетки экспрессируют цитокин-распознающие рецепторы – TNFR1 (TNF receptor 1) и EGFR (epidermal growth factor receptor), а также рецепторы, которые распознают антимикробные белки и пептиды, лектины С-типа, участвующие в распознавании дрожжей, грибов и микобактерий.

RLRs, вторая группа рецепторов врожденного иммунитета, которые конститутивно экспрессируются в эпителиальных клетках дыхательных путей, включает цитозольные рецепторы RIG-1 (retinoic acid inducible gene) и MDA-5 (melanoma differentiation protein), распознающие вирусные РНК.

В цитозоле эпителиальные клетки экспрессируют рецепторы NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors), распознающие пептидогликаны клеточной стенки бактерий. Наибольшую роль в антибактериальном иммунитете играют NOD1-рецептор, распознающий пептидогликан грам-отрицательных бактерий, и NOD2-рецептор, распознающий пептидогликан и грам-положительных, и грам-отрицательных бактерий. Более подробную информацию о рецепторах эпителиальных клеток можно найти в обзорах [5, 7].

Как видно из представленного выше материала, эпителиальные клетки дыхательного тракта располагают рецепторным аппаратом, позволяющим распознавать практически любые консервативные структуры как патогенных, так и непатогенных микробов. Но именно эта способность создает для эпителиальных клеток, в отличие от профессиональных клеток иммунной системы, некоторые проблемы для нормального функционирования. «Профессиональные» клетки иммунной системы нейтрофилы и моноциты/макрофаги встречаются с патогенными микробами, которые проникли в организм через эпителиальный барьер и подлежат безусловному уничтожению. У эпителиальных клеток всех слизистых оболочек, но особенно дыхательных путей, более сложная задача: эти клетки контактируют с постоянно меняющимся микробным составом. Поэтому

у PRR эпителиальных клеток, в частности у TLR, должен быть механизм, обеспечивающий максимальный защитный ответ на патогенные микроорганизмы при минимальном ответе на непатогенные. Такая коррективка достигается несколькими путями. Один из них – регуляция уровня экспрессии поверхностных TLR2 и TLR4, играющих ведущую роль в инициации антибактериального иммунитета. В норме экспрессия этих рецепторов в эпителиальных клетках дыхательных путей снижена, и прямая стимуляция этих клеток грам-положительными бактериями или ЛПС не приводит к их активации [8]. Кроме того, пониженный ответ эпителиальных клеток на PAMP может быть связан с пониженной экспрессией на этих клетках адаптерных белков, необходимых для оптимального антибактериального ответа. К таким белкам относятся CD36 – кофактор TLR2, а также MD2 и CD14, которые являются кофакторами TLR4 [8, 10–12].

Способствовать различению патогенной и комменсальной микрофлоры также может неравномерное распределение TLR между апикальной и базолатеральной поверхностью эпителиоцитов, а также различие эффектов активации TLR на апикальной и базолатеральной поверхностях эпителиоцитов. При воздействии PAMP на TLR, находящиеся на базолатеральной поверхности эпителиоцитов (которая, как считается, в норме не контактирует с PAMP комменсальной микрофлоры), индуцируется экспрессия провоспалительных генов [13–16].

Эпителиальные клетки дыхательных путей как инициаторы врожденного иммунного ответа

Распознавание PAMPs рецепторами эпителиальных клеток, PRRs, ведет к активации сигнальных путей, конечным результатом которой является активация эпителиоцитов. Это первый этап развития антимикробного ответа, и эпителиальная клетка, образно говоря, выступает как дирижер, от которого зависит последующее развитие событий [17, 18]. При наилучшем стечении обстоятельств взаимодействие микро- и макроорганизма заканчивается на уровне эпителиальных клеток бронхолегочного аппарата без проникновения микроорганизма во внутреннюю среду организма человека. Но в любом случае взаимодействие PAMPs с PRRs эпителиальной клетки вызывает активацию последней, что проявляется в экспрессии ряда транскрипционных факторов, в частности ядерного фактора NF-κB, фактора AP-1 (activator protein-1), фактора IRF3/7 (interferon regulatory factor 3/7) и др.

Наибольшую роль в активации эпителиальных клеток играет транскрипционный фактор NF-κB, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. В цитоплазме покоящейся клетки NF-κB находится в димерной форме и образует неактивный комплекс с ингибитором I-κBa. При активации внутриклеточная киназа IKK фосфорилирует этот ингибитор. Фосфорилированный I-κBa убиквитинилируется и подвергается 26S-протеасомной деградации. Освобожденный от ингибитора NF-κB мигрирует в ядро

и активирует контролируемые гены [19]. Происходит активация эпителиальной клетки.

Так как эпителиальные клетки первыми встречаются с микробами и их лигандами, проникшими в макроорганизм, представлялось важным установить вклад фактора NF-κB эпителиальных клеток бронхолегочной системы в развитие врожденного иммунного ответа. С помощью трансгенных мышей, экспрессирующих в эпителиальных клетках дыхательных путей мутантный фактор NF-κB, неспособный мигрировать в ядро и, следовательно, активировать соответствующие гены, было показано, что развития врожденного иммунного ответа при интраназальном введении ЛПС не происходит. Это проявляется в отсутствии миграции нейтрофилов в верхние дыхательные пути и резком понижении продукции провоспалительных цитокинов, хемокинов, MIP-2 (аналог ИЛ-8 у мыши) и ФНОα [20].

Передачу сигнала фактору NF-κB от IL-1R и IL-18R, а также всех TLR, за исключением TLR3, осуществляет адаптерный белок MyD88 [19, 21]. Значимость MyD88 в инфекционной патологии подтверждают данные о высокой смертности мышей с нокаутом гена *MyD88* (*MyD88^{-/-}*) при интраназальном заражении классическим легочным патогеном *Pseudomonas aeruginosa* [22, 23]. Описаны мутации в этом белке у людей, страдающих частыми пиогенными инфекциями [24].

Поэтому было важно установить роль адаптерного белка MyD88 в ответе эпителиальных клеток дыхательных путей при их взаимодействии с лигандами PAMP. Для этого созданы трансгенные мыши, у которых ген *MyD88* экспрессировался от промотора белка CC10, синтезируемого эпителиальными клетками и активного только в бронхиальном эпителии. В опыте использовали мышей дикого типа, трансген-негативных мышей, не экспрессирующих белок MyD88 (*MyD88^{-/-}*) и трансген-позитивных мышей, экспрессирующих белок MyD88 только в бронхиальном эпителии (*MyD88^{-/-cc10MyD}*). Через 4, 12 и 24 ч после интраназального заражения *P. aeruginosa* легкие трансген-позитивных мышей были почти полностью (на 99 %) свободны от бактерий и практически не имели поражений, тогда как в легких трансген-негативных мышей наблюдались серьезные поражения: облитерации, геморрагии, изъязвления [25].

Полученные результаты показали необходимость участия эпителиальных клеток дыхательного тракта и белка MyD88, являющегося адаптером рецепторов TLR2, TLR4, TLR5, в формировании антибактериального иммунитета на самом первом этапе развития инфекционного процесса. Оказалось, что нормальное функционирование адаптерного белка MyD88 более важно для защиты от *P. aeruginosa*, чем функционирование рецепторов TLR2/TLR4/TLR5, так как их блокада не ухудшала ответ на патоген в той же мере, как отсутствие MyD88 [25].

Представленные данные показывают исключительно важную роль фактора NF-κB, локализованного именно в эпителиальных клетках, в инициации врожденного иммунного ответа. Следует подчеркнуть, что

у трансгенных мышей, используемых в этих опытах, фактор NF-κB был выключен только в эпителиальных клетках дыхательных путей при полном сохранении его функциональной активности в альвеолярных макрофагах и других клетках иммунной системы [20].

Ведущая роль эпителиальных клеток в антиинфекционной защите хорошо показана также на модели вирусных инфекций, в частности на модели парамиксовирусной инфекции (вирус Сендай). Обнаружено, что главным ранним событием в респираторной парамиксовирусной инфекции является активация ИФН-сигнального белка STAT1 в эпителиальных клетках дыхательного тракта. При интраназальном заражении вирусом Сендай у мышей *STAT1^{-/-}* развивается тяжелая пневмония, характеризующаяся повышенной вирусной репликацией, нейтрофильным воспалением с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов ФНОα и CXCL2. Мыши *STAT1^{-/-}*, восстановленные костным мозгом нормальных животных, продолжали оставаться высокочувствительными к вирусу Сендай [26]. Эти данные являются убедительным доказательством ведущей роли эпителиальных клеток дыхательного тракта во врожденном иммунном ответе, особенно на первых этапах его развития.

Становится очевидно, что одной из главных задач иммуностимулирующей терапии должна быть активация антимикробных свойств эпителиальных клеток бронхолегочного аппарата. Нужно четко понимать, что в организме существуют защитные процессы, в комплексе формирующие врожденный иммунитет. В его организации помимо миелоидных и лимфоидных клеток принимают участие эпителиальные клетки всех слизистых оболочек и клетки эндотелия сосудов. Все вместе они составляют единый защитный комплекс, направленный на сохранение постоянства внутренней среды организма. Поэтому при проведении иммуностимулирующей терапии нужно учитывать эффект препарата не только на клетки иммунной системы, но и на клетки эпителия. В перспективе целесообразно разрабатывать и внедрять методы оценки функциональной активности клеток эндотелия в норме и патологии, прежде всего инфекционной.

Основанием для применения иммуностимулирующей терапии являются клиническая картина заболевания и данные об иммунном статусе. При выборе иммуностимулятора предпочтение отдают препаратам с точно установленной химической формулой и механизмом действия. К таким препаратам можно отнести мурамилдипептид (МДП), являющийся главным компонентом пептидогликана клеточной стенки всех бактерий. В организме человека МДП и глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) – лечебный препарат, синтезированный на его основе, распознаются NOD2-рецептором. Этот иммуностимулятор может активировать бронхиальные эпителиальные клетки, что проявляется в увеличении экспрессии в них NOD2-рецептора, в синтезе провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и антимикробного пептида β-дефензина [27–29]. Интересно,

что иммуностимулятор МДП обладает способностью увеличивать экспрессию NOD2-рецептора в таких пограничных клетках, как клетки эндотелия. Это ведет к фосфорилированию в этих клетках ИФН-регуляторного фактора IRF3 и синтезу ИФН 1-го типа. Происходит существенное усиление противоинфекционной защиты организма [30].

Особенности иммуностимуляции

Как уже отмечалось, первый этап врожденного иммунного ответа состоит в распознавании PAMPs соответствующими PRRs эпителиальных клеток дыхательного тракта, в основном относящихся к Толл-подобным рецепторам. Далее с помощью адаптерных белков, в частности MyD88, ассоциированных с этими рецепторами, осуществляется передача активационного сигнала транскрипционному фактору NF- κ B, результатом чего являются активация эпителиальных клеток и синтез ими ряда биологически активных молекул. Как уже отмечалось, за исключением фагоцитоза, бронхиальные эпителиальные клетки могут выполнять все функции «профессиональных» клеток врожденного иммунитета. Поэтому представляется логичным, что при проведении иммуностимулирующей терапии основной эффект следует направить на повышение функциональной активности эпителиальных клеток, в частности на повышение антимикробных свойств эпителиоцитов. Возможно, в случае интраназального заражения при невысокой вирулентности и небольшой инфицирующей дозе микроорганизма тех защитных сил, которые создаются только эпителиальными клетками дыхательного тракта, может быть достаточно для подавления размножения и, соответственно, распространения этого микроорганизма.

При этом следует иметь в виду, что иммунные процессы, осуществляемые «профессиональными» клетками иммунной системы, могут инициировать неоднозначные эффекты. Это, например, показано на модели гриппозной вирусной инфекции. Помимо цитоплазматического рецептора TLR3, вирусная РНК распознается цитоплазматическими рецепторами RIG-1 и MDA5, которые активируют различные сигнальные пути, используя разные белки-адаптеры. Передача сигнала рецептора TLR3 происходит с участием адаптерной молекулы TRIF, приводит к активации транскрипционного фактора NF- κ B и, в итоге, к синтезу провоспалительных цитокинов ИЛ-8 и ИЛ-6. Для передачи сигнала рецептора RIG-1 используется адаптерная молекула MAVS, что ведет к активации транскрипционного фактора IRF-3 и, в итоге, к синтезу ИФН 1-го типа [31]. Развиваются два относительно независимых иммунологических процесса. У мышей *TLR3^{-/-}* не происходит образования ИЛ-6 и ИЛ-8, но хорошо развивается антивирусная защита и выше выживаемость при интраназальном заражении вирусом гриппа по сравнению с мышами дикого типа, хотя у последних развивается и провоспалительная, и антивирусная активность [32]. Очевидно, провоспалительный ответ может иметь по-

вреждающий эффект на ткани организма и целесообразно попытаться разделить провоспалительный и антимикробный ответы. Поэтому при иммуностимуляции следует разрабатывать схемы, с помощью которых в разумных пределах максимально стимулируются антимикробные факторы (кателицидины, β -дефензины и др.) и не происходит неконтролируемой продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов.

Особенностью врожденного иммунного ответа эпителиальных клеток дыхательного тракта на вирусы является способность, помимо ИФН 1-го типа, продуцировать ИФН 3-го типа (ИФН- λ) [33, 34]. Хотя для активации клетки-мишени ИФН 1 и 3-го типов используют различные рецепторы, они индуцируют идентичные сигнальные пути с одинаковыми биологическими эффектами. Важно отметить, что биологический эффект ИФН 3-го типа проявляется только в пределах дыхательного и желудочно-кишечного тракта, так как рецепторы этого интерферона экспрессируются только на эпителиальных клетках [35]. Синтез ИФН 3-го типа является доминантным в цитокиновом ответе эпителиальных клеток на вирусные PAMP [36]. Продукция ИФН 3-го типа всегда происходит с минимальными повреждениями органов и тканей хозяина.

Заключение

Серьезным шагом вперед в клинической иммунологии стало обнаружение у эпителиальных клеток всех слизистых оболочек PRRs, с помощью которых они узнают чужеродный материал (вирусы, бактерии, грибы). Эпителиальные клетки распознают также эндогенные молекулы, образующиеся в поврежденных, погибающих или изменившихся в результате генетических мутаций клетках. Иначе говоря, эпителиоциты располагают всеми необходимыми структурами, позволяющими распознавать и уничтожать все генетически чужеродное, как экзогенной, так и эндогенной природы. Сравнительно недавно было установлено, что они наделены некоторыми элементами специфичности и памяти. В силу наличия распознающих рецепторов эпителиоциты дыхательного тракта, помимо создания простого физического барьера, являются инициаторами иммунного ответа против возбудителя. Поэтому одной из главных задач иммуностимуляции, в случае необходимости ее проведения, является повышение функциональной активности эпителиальных клеток. Причем это повышение в основном должно быть направлено на усиление антимикробных свойств эпителиальных клеток и в меньшей степени – на усиление воспалительной реакции. Только с помощью такого подхода защита, создаваемая слизистой оболочкой дыхательного тракта, может стать безопасной и непреодолимой.

В предыдущей статье [37] настоящего номера журнала приведены данные о том, что соединения мурамилдипептидного ряда (МДП), в частности ГМДП, активируют клетки врожденного иммунитета, а затем и адаптивного иммунного ответа, взаимодействуя с NOD2-рецептором [38–41]. Примечательно, что мо-

лекулы МДП-ряда активируют эпителиальные клетки респираторного тракта через эти же рецепторы, то есть стимулируют врожденный иммунный ответ дыхательных путей. В целом, все это дает основание полагать, что лекарственные препараты на основе МДП и кон-

кретно ГМДП должны быть эффективными при профилактике и лечении острых респираторных заболеваний и острых респираторно-вирусных инфекций, а также других вирусных и бактериальных инфекций дыхательного, желудочно-кишечного и урогенитального тракта.

■ Литература

- Barnes P.J., Chung F., Page C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50: 515–96.
- Weitnauer M., Mijosek V., Dalpke A.H. Control of local immunity by airway epithelial cells. *Mucosal Immunol.* 2016; 9: 287–98.
- Kim K.C. Role of epithelial mucins during airway infection. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2012; 25: 415–9.
- Tilley A.E., Walters M.S., Shaykhiiev R., Crystal R.G. Cilia dysfunction in lung disease. *Annu. Rev. Physiol.* 2015; 77: 379–406.
- Parker D., Prince A. Innate Immunity in the respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011; 45: 189–201.
- Denney L., Ho L.-P. The role of respiratory epithelium in host defence against influenza virus infection. *Biomed. J.* 2018; 41: 218–33.
- Козлов И.Г. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотики: тонкости взаимодействия. *Российский медицинский журнал.* 2018; 2 (1): 1–11.
- Mayer A.K., Muehmer M., Mages J., Gueinzus K., Hess C., Heeg K., Bals R., Lang R., Dalpke A.H. Differential recognition of TLR-different microbial ligand in human bronchial epithelial cells. *J. Immunol.* 2007; 178: 3134–42.
- Gon Y., Hashimoto S. Role of airway epithelial barrier dysfunction in pathogenesis of asthma. *Allergol. Int.* 2018; 67: 12–7.
- Ioannidis I., Ye F., McNally B., Willette M., Flano F. Toll-like receptor expression and induction of type I and type III interferons in primary airway epithelial cells. *J. Virol.* 2013; 87: 3261–70.
- Becker M.N., Diamond G., Verghese W., Randell S.H. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin expression of human tracheobronchial epithelium. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 29731.
- Jia H.P., Kline J.N., Penisten A., Apicella M.A., Gioannini T.L., Weiss J., McCray P.B. Jr. Endotoxin responsiveness of human airway epithelia is limited by low expression of MD-2. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004; 287: L428–37.
- Gewirtz A.T., Navas T.A., Lyons S., Godowski P.J., Madara J.L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* 2001; 167: 1882–5.
- Lee J., Mo J.H., Katakura K., Alkalay I., Rucker A.N., Liu Y.T., Lee H.K., Shen C., Cojocaru G., Shenouda S., Kagnoff M., Eckmann L., Ben-Neriah Y., Raz E. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8: 1327–36.
- Vamadevan A.S., Fukata M., Arnold E.T., Thomas L.S., Hsu D., Abreu M.T. Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate Immun.* 2010; 16: 93–103.
- Shaykhiiev R., Sierigk J., Herr C., Krasteva G., Kummer W., Bals R. The antimicrobial peptide cathelicidin enhances activation of lung epithelial cells by LPS. *FASEB J.* 2010; 24: 4756–66.
- Whitsett J.A., Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Immunol.* 2014; 16: 27–35.
- Roan F., Obata-Ninomiya K., Ziegler S.F. Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm. *J. Clin. Invest.* 2019; 129: 1441–51.
- Takeuchi O., Akira S. MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signalling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002; 270: 155–67.
- Poynter M.E., Irvin C.G., Jansenn-Heininger Y.M.W. A prominent role for airway epithelial NF- κ B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *J. Immunol.* 2003; 170: 6257–65.
- Medzhitov R.M. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; 1: 135–45.
- Power M.R., Peng Y., Maydanski E., Marshall J.S., Lin T.J. The development of early host response to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is critically dependent on myeloid differentiation factor 88 in mice. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 49 315–22.
- Skerrett S.J., Liggitt H.D., Hajjar A.M., Wilson C.B. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against *Pseudomonas aeruginosa* but not *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 2004; 172: 3377–81.
- von Bernuth H., Picard C., Jin Z., Pankla R., Xiao H., Ku C.L., Chrabieh M., Mustapha I.B., Ghandil P., Camcioglu Y., Vasconcelos J., Sirvent Nedes M. et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science.* 2008; 321: 691–6.
- Mijares L.A., Wangdi T., Sokol C., Homer R., Medzhitov R., Kazmierczak B.I. Airway epithelial MyD88 restores control of *Pseudomonas aeruginosa* murine infection via an interleukin-1 dependent pathway. *J. Immunol.* 2011; 186: 7080–8.
- Shornick L.P., Wells A.G., Zhang Y., Patel A.C., Huang G., Takami K., Sosa M., Shukla N.A., Agapov E., Holtzman M.J. Airway epithelial versus immune cell Stat1 function for innate defense against respiratory viral infection. *J. Immun.* 2008; 180: 3319–28.
- Farkas L., Stoelcker B., Jentsch N., Heitzer S., Pfeifer M., Schulz C. Muramyl dipeptide modulates CXCL-8 release of BEAS-2B cells via NOD2. *Scand. J. Immunol.* 2008; 68: 315–22.
- Qiu H.N., Wong C.K., Chul I.M., Hu S., Lam C.M. 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.
- LeBel M., Gosselin J. Leukotriene B4 enhances NOD2-dependent innate response against Influenza virus infection. *PLoS One.* 2015; 10 (10): e0139856.
- Lv Q., Yang M., Liu X., Zhou L., Xiao Z., Chen X., Chen M., Xie X., Hub J. MDP up-regulates the gene expression of type I interferons in human aortic endothelial cells. *Molecules.* 2012; 17: 3599–608.
- Goffic R.L., Pothlicher J., Vitour D., Fujita T., Meurs E., Chignard M., Si-Tahar M. Cutting edge: influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J. Immunol.* 2007; 178: 3368–72.
- Goffic R.L., Balloy V., Lagranderie M., Alexopoulou L., Escriou N., Flavell R., Chignard M., Si-Tahar M. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR) 3 to Influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathogens.* 2006; 2 (6): e53.
- Khaitov M.R., Laza-Stanca V., Edwards M.R., Walton R.P., Rohde G., Conton M. et al. Respiratory virus induction of alpha-, beta- and lambda-interferons in bronchial epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *Allergy.* 2009; 64: 375–86.
- Wang J., Oberley-Deegan R., Wang S., Nikard M., Funk C.J., Hartshorn K.I. et al. Differentiated human alveolar type II cells secrete antiviral IL-29 (IFN-lambda 1) in response to influenza A infection. *J. Immunol.* 2009; 182: 1296–304.
- Wack A., Terzyska-Dyla E., Hartmann R. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nat. Immunol.* 2015; 16: 802–9.
- Nice T.J., Baldrige M.T., McCune B.T., Nortman J.M., Lazear H.M., Artyomov M. et al. Interferon-lambda cures persistent murine norovirus infection in the absence of adaptive immunity. *Science.* 2015; 347 (6219): 269–73.
- Хайтов Р.М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность. *Иммунология.* 2020; 41 (2): 101–6.
- Хайтов Р.М. Главная мишень иммунологического действия ГМДП (Ликопада). *Иммунология.* 1994; 2: 47–50.
- Иванов В.Т., Хайтов Р.М., Андропова Т.М., Пинегин Б.В. Ликопад (глюкозаминилмурамилдипептид) – новый отечественный высокоэффективный 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 ликопада. *Иммунология.* 1998; 18: 60–3.
- Пинегин Б. В., Хайтов Р.М. Современные принципы создания иммуноотропных лекарственных препаратов. *Иммунология.* 2019; 40 (6): 57–62.

References

- Barnes P.J., Chung F., Page C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50: 515–96.
- Weitnauer M., Mijosek V., Dalpke A.H. Control of local immunity by airway epithelial cells. *Mucosal Immunol.* 2016; 9: 287–98.
- Kim K.C. Role of epithelial mucins during airway infection. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2012; 25: 415–9.
- Tilley A.E., Walters M.S., Shaykhiyev R., Crystal R.G. Cilia dysfunction in lung disease. *Annu. Rev. Physiol.* 2015; 77: 379–406.
- Parker D., Prince A. Innate Immunity in the respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011; 45: 189–201.
- Denney L., Ho L.-P. The role of respiratory epithelium in host defence against influenza virus infection. *Biomed. J.* 2018; 41: 218–33.
- Kozlov I.G. Microbiota, mucosal immunity and antibiotics: subtleties of interaction. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal.* 2018; (1): 1–11. (in Russian)
- Mayer A.K., Muehmer M., Mages J., Gueinzus K., Hess C., Heeg K., Bals R., Lang R., Dalpke A.H. Differential recognition of TLR-different microbial ligand in human bronchial epithelial cells. *J. Immunol.* 2007; 178: 3134–42.
- Gon Y., Hashimoto S. Role of airway epithelial barrier dysfunction in pathogenesis of asthma. *Allergol. Int.* 2018; 67: 12–7.
- Ioannidis I., Ye F., McNally B., Willette M., Flano F. Toll-like receptor expression and induction of type I and type III interferons in primary airway epithelial cells. *J. Virol.* 2013; 87: 3261–70.
- Becker M.N., Diamond G., Verghese W., Randell S.H. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin expression of human tracheobronchial epithelium. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 29731.
- Jia H.P., Kline J.N., Penisten A., Apicella M.A., Gioianni T.L., Weiss J., McCray P.B. Jr. Endotoxin responsiveness of human airway epithelia is limited by low expression of MD-2. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004; 287: L428–37.
- Gewirtz A.T., Navas T.A., Lyons S., Godowski P.J., Madara J.L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* 2001; 167: 1882–5.
- Lee J., Mo J.H., Katakura K., Alkalay I., Rucker A.N., Liu Y.T., Lee H.K., Shen C., Cojocaru G., Shenouda S., Kagnoff M., Eckmann L., Ben-Neriah Y., Raz E. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8: 1327–36.
- Vamadevan A.S., Fukata M., Arnold E.T., Thomas L.S., Hsu D., Abreu M.T. Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate Immun.* 2010; 16: 93–103.
- Shaykhiyev R., Sierigk J., Herr C., Krasteva G., Kummer W., Bals R. The antimicrobial peptide cathelicidin enhances activation of lung epithelial cells by LPS. *FASEB J.* 2010; 24: 4756–66.
- Whitsett J.A., Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Immunol.* 2014; 16: 27–35.
- Roan F., Obata-Ninomiya K., Ziegler S.F. Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm. *J. Clin. Invest.* 2019; 129: 1441–51.
- Takeuchi O., Akira S. MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signalling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002; 270: 155–67.
- Poynter M.E., Irvin C.G., Jansenn-Heininger Y.M.W. A prominent role for airway epithelial NF- κ B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *J. Immunol.* 2003; 170: 6257–65.
- Medzhitov R.M. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; 1: 135–45.
- Power M.R., Peng Y., Maydanski E., Marshall J.S., Lin T.J. The development of early host response to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is critically dependent on myeloid differentiation factor 88 in mice. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 49 315–22.
- Skerrett S.J., Liggitt H.D., Hajjar A.M., Wilson C.B. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against *Pseudomonas aeruginosa* but not *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 2004; 172: 3377–81.
- von Bernuth H., Picard C., Jin Z., Pankla R., Xiao H., Ku C.L., Chrabieh M., Mustapha I.B., Ghandil P., Camcioglu Y., Vasconcelos J., Sirvent Nedes M., et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science.* 2008; 321: 691–6.
- Mijares L.A., Wangdi T., Sokol C., Homer R., Medzhitov R., Kazmierczak B.I. Airway epithelial MyD88 restores control of *Pseudomonas aeruginosa* murine infection via an interleukin-1 dependent pathway. *J. Immunol.* 2011; 186: 7080–8.
- Shornick L.P., Wells A.G., Zhang Y., Patel A.C., Huang G., Takami K., Sosa M., Shukla N.A., Agapov E., Holtzman M.J. Airway epithelial versus immune cell Stat1 function for innate defense against respiratory viral infection. *J. Immunol.* 2008; 180: 3319–28.
- Farkas L., Stoelcker B., Jentsch N., Heitzer S., Pfeifer M., Schulz C. Muramyl dipeptide modulates CXCL-8 release of BEAS-2B cells via NOD2. *Scand. J. Immunol.* 2008; 68: 315–22.
- Qiu H.N., Wong C.K., Chul I.M., Hu S., Lam C.M. 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.
- LeBel M., Gosselin J. Leukotriene B4 enhances NOD2-dependent innate response against Influenza virus infection. *PLoS One.* 2015; 10 (10): e0139856.
- Lv Q., Yang M., Liu X., Zhou L., Xiao Z., Chen X., Chen M., Xie X., Hub J. MDP up-regulates the gene expression of type I interferons in human aortic endothelial cells. *Molecules.* 2012; 17: 3599–608.
- Goffic R.L., Pothlicher J., Vitour D., Fujita T., Meurs E., Chignard M., Si-Tahar M. Cutting edge: influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J. Immunol.* 2007; 178: 3368–72.
- Goffic R.L., Balloy V., Lagranderie M., Alexopoulou L., Escriou N., Flavell R., Chignard M., Si-Tahar M. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR) 3 to Influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathogens.* 2006; 2 (6): e53.
- Khaitov M.R., Laza-Stanca V., Edwards M.R., Walton R.P., Rohde G., Conton M., et al. Respiratory virus induction of alpha-, beta- and lambda-interferons in bronchial epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *Allergy.* 2009; 64: 375–86.
- Wang J., Oberley-Deegan R., Wang S., Nikrad M., Funk C.J., Hartshorn K.I., et al. Differentiated human alveolar type II cells secrete antiviral IL-29 (IFN-lambda 1) in response to influenza A infection. *J. Immunol.* 2009; 182: 1296–304.
- Wack A., Terzynska-Dyla E., Hartmann R. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nat. Immunol.* 2015; 16: 802–9.
- Nice T.J., Baldrige M.T., McCune B.T., Nortman J.M., Lazear H.M., Artyomov M., et al. Interferon-lambda cures persistent murine norovirus infection in the absence of adaptive immunity. *Science.* 2015; 347 (6219): 269–73.
- Khaitov R.M. Immunomodulators: myths and reality. *Immunologiya.* 2020; 41 (2): 101–6. (in Russian)
- Khaitov R.M. The main target of immunological actions of GMDP (Licopid). *Immunologiya.* 1994; 2: 47–50. (in Russian)
- Ivanov V.T., Khaitov R.M., Andronova T.M., Pinegin B.V. Licopid (glucosaminylmuramyl dipeptide) – a new Russian highly effective immunomodulator for the treatment and prevention of diseases associated with secondary immunological insufficiency. *Immunologiya.* 1996; 2: 4–6. (in Russian)
- Pinegin B.V., Andronova T.M. Some theoretical and practical issues of clinical application of immunomodulator Licopid. *Immunologiya.* 1998; 18: 60–3. (in Russian)
- Pinegin B.V., Khaitov R.M. Modern principles of immunotropic drugs creation. *Immunologiya.* 2019; 40 (6): 57–62. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2020

Муругина Н.Е.¹, Будихина А.С.¹, Муругин В.В.¹, Селезнева Е.М.²,
Чкадуа Г.З.³, Пашенков М.В.¹

Роль NF-κB в развитии синергического ответа макрофагов человека на сочетанную стимуляцию рецепторов NOD1 и TLR4 *in vitro*

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. При сочетанной активации макрофагов агонистами рецепторов NOD1 и TLR4 наблюдается синергическое усиление экспрессии цитокинов: ответ клеток на сочетание агонистов выше, чем сумма ответов на каждый агонист по отдельности. Важнейшую роль в индукции экспрессии цитокинов при стимуляции NOD1 и TLR4 играют факторы транскрипции семейства NF-κB.

Цель работы – изучить характер активации NF-κB-зависимого сигнального пути в макрофагах при одновременном добавлении агонистов NOD1 и TLR4, сравнить кинетику активации NF-κB-зависимого сигнального пути с кинетикой экспрессии мРНК *TNF* и *IL6*.

Материал и методы. Макрофаги получали из моноцитов крови здоровых доноров и стимулировали их агонистом NOD1 (N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамил-мезо-диаминопимелиновой кислотой), агонистом TLR4 (липополисахаридом) и их сочетанием, мРНК *TNF* и *IL6* определяли с помощью ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией; уровни белков NF-κB в ядре, а также уровни ингибиторного белка IκBα в цитоплазме и в ядре – с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. Показано, что транслокация белков NF-κB (p65/RelA, c-Rel, p50) в ядро в первые 4 ч сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4 носит несинергический характер. Однако на выходе из ядра после 150-й минуты сочетанной стимуляции наблюдается синергическое усиление экспрессии мРНК *TNF* и *IL6*. Рассматривается возможный вклад относительного дефицита IκBα в ядре в формирование синергического эффекта.

Заключение. Синергическое усиление экспрессии цитокинов при одновременной активации NOD1 и TLR4 не объясняется синергической активацией NF-κB-зависимого сигнального пути.

Ключевые слова: макрофаги; NOD1; TLR4; синергизм; NF-κB; фактор некроза опухолей

Статья поступила 07.02.2020. Принята в печать 20.02.2020.

Для цитирования: Муругина Н.Е., Будихина А.С., Муругин В.В., Селезнева Е.М., Чкадуа Г.З., Пашенков М.В. Роль NF-κB в развитии синергического ответа макрофагов человека на сочетанную стимуляцию рецепторов NOD1 и TLR4 *in vitro*. Иммунология. 2020, 41 (2): 114–123. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-114-123

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского научного фонда №16-15-10314.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Murugina N.E.¹, Budikhina A.S.¹, Murugin V.V.¹, Selezneva E.M.²,
Chkadua G.Z.³, Pashenkov M.V.¹

The role of NF-κB in the synergistic response of human macrophages to combined stimulation of NOD1 and TLR4 receptors *in vitro*

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

¹ National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation

³ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Stimulation of macrophages by a combination of NOD1 and TLR4 receptor agonists results in a synergistic enhancement of cytokine expression: cellular response to the combination of agonist is greater than the sum of responses to each individual agonist. A central role in NOD1- and TLR4-dependent cytokine expression belongs to the NF-κB family of transcription factors.

Aims – to investigate the mode of activation of NF-κB-dependent signaling pathway in macrophages upon their treatment with a combination of NOD1 and TLR4 agonists, to compare kinetics of NF-κB pathway activation with kinetics of *TNF* and *IL6* mRNA expression.

Material and methods. Macrophages were obtained from blood monocytes of healthy donors and stimulated with NOD1 agonist (N-acetyl-D-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-*meso*-diaminopimelic acid), TLR4 agonist (lipopolysaccharide) and their combination. *TNF* and *IL6* mRNA were determined by reverse-transcription real-time PCR, levels of NF-κB proteins in the nucleus and of IκBα in the cytoplasm and in the nucleus by Western blotting.

Results. Translocation of NF-κB proteins (p65/RelA, c-Rel, p50) to the nucleus during the first 4 h of combined NOD1 and TLR4 stimulation is not synergistic. However, at the output of the nucleus, a synergistic enhancement of *TNF* and *IL6* mRNA expression is observed after 150 minutes of combined receptor stimulation. We consider possible role of relative deficiency of nuclear IκBα in the development of the synergistic response.

Conclusion. Synergistic enhancement of cytokine expression upon simultaneous NOD1 and TLR4 activation is not explained by synergistic activation of the NF-κB-dependent signaling pathway.

Keywords: macrophages; NOD1; TLR4; synergy; NF-κB; tumor necrosis factor

Received 07.02.2020. Accepted 20.02.2020.

For citation: Murugina N.E., Budikhina A.S., Murugin V.V., Selezneva E.M., Chkadua G.Z., Pashenkov M.V. The role of NF-κB in the synergistic response of human macrophages to combined stimulation of NOD1 and TLR4 receptors *in vitro*. *Immunologiya*. 2020; 41 (2): 114–23. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-114-123 (in Russian)

Funding. The study was supported by the grant of Russian Science Foundation No. 16-15-10314.

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

Введение

Представители семейства Toll-подобных рецепторов (TLR), а также рецепторы NOD1 и NOD2 из семейства NOD-подобных рецепторов являются основными сенсорами бактериальных патогенов в клетках врожденной иммунной системы. Ведущую роль в узнавании грам-отрицательных бактерий играют два рецептора: NOD1, распознающий фрагменты пептидогликана (мурамилпептиды) [1, 2], и TLR4, распознающий липополисахарид (ЛПС) [3]. NOD1 и TLR4 находятся, соответственно, в цитозоле и на поверхностной мембране клеток врожденной иммунной системы.

Известно, что рецепторы NOD1 и NOD2 синергически взаимодействуют с TLR как *in vitro*, так и *in vivo* [4–8]. Ответ клеток на стимуляцию агонистом NOD1 или NOD2 в сочетании с агонистом какого-либо TLR, как правило, превышает сумму ответов на каждый агонист по отдельности [9]. Предполагается, что гиперпродукция цитокинов, вызванная синергическими взаимодействиями рецепторов, может приводить

к жизнеугрожающему системному воспалительному ответу, лежащему в основе сепсиса и септического шока [8]. С другой стороны, контролируемые синергические взаимодействия рецепторов могут быть использованы в терапевтических целях для повышения резистентности организма против патогенов [10]. Несмотря на то что феномен синергического взаимодействия NOD-рецепторов и TLR достаточно хорошо описан, его механизмы до сих пор не раскрыты, хотя такие попытки предпринимались [11–15].

Ключевую роль в реализации биологических эффектов NOD-рецепторов и TLR играют факторы транскрипции семейства NF-κB [16, 17]. Это семейство включает пять белков: p105/p50, p65 (RelA), RelB, c-Rel и p100/p52 [16]. В неактивированных клетках белки NF-κB находятся в цитоплазме в виде димеров, связанных с ингибиторными белками семейства IκB. Сигнальные пути как от NOD-рецепторов, так и от TLR приводят к активации киназы IKK (IκB kinase), которая фосфорилирует белки IκB, что является пусковым сигналом для

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

их протеасомной деградации [12, 18–20]. Освободившись от связи с IκB, димеры NF-κB поступают в ядро, где связываются с промоторами более 500 генов врожденного иммунного ответа, регулируя их экспрессию. Описанная последовательность событий составляет суть так называемого канонического пути активации NF-κB, в котором участвуют белки p105/p50, p65, c-Rel и RelB [16]. При этом различные по составу димеры по-разному влияют на транскрипцию мРНК: за активацию транскрипции отвечают гомо- и гетеродимеры, содержащие p65 и c-Rel, тогда как гомодимеры p50:p50 обладают ингибирующим действием [16, 21]. Ключевую роль в неканоническом пути активации NF-κB играет белок p100/p52. Этот сигнальный путь участвует в сравнительно поздних этапах активации клетки агонистами NOD- и TLR-рецепторов [22].

Поскольку сигнальные пути от NOD-рецепторов и TLR сходятся на киназе ИКК, предпринимались попытки объяснить синергическое взаимодействие NOD-TLR синергической активацией этой киназы. По данным D.W. Abbott и соавт., при сочетанной стимуляции рецепторов NOD2 и TLR2 в моноцитoidных клетках THP-1 наблюдается более мощная и продолжительная активация ИКК и, как следствие, более быстрая и более полная деградация белка IκBa – основного представителя семейства IκB [23]. Тем не менее, непонятно, почему схождение сигнальных путей на киназе ИКК должно приводить именно к ее синергической активации: простая логика подсказывает, что каждый из сигнальных путей будет активировать определенную часть общего пула ИКК, что будет вести в лучшем случае к суммации эффектов, а не к синергизму. Действительно, по данным другой работы, при сочетанной стимуляции клеток THP-1 агонистами NOD2 и TLR4 в течение 20 мин уровни фосфорилированных белков ИКК α/β (каталитических субъединиц ИКК) и фосфорилированного IκBa суммируются, но синергических эффектов на этом уровне не наблюдается [11].

Транслокация белков NF-κB в ядро во многих случаях не является разовым событием, а носит колебательный характер [24, 25]. Колебания особенно характерны для ответа клеток на ФНО, но возможны и при стимуляции TLR [24, 25]. Формирование колебаний обусловлено, в частности тем, что ген *NFKBIA*, кодирующий ингибиторный белок IκBa, сам является NF-κB-индуцибельным. Первая волна поступления NF-κB в ядро индуцирует синтез IκBa *de novo*. Этот IκBa тоже поступает в ядро, способствуя отделению белков NF-κB от промоторов и их экспорту из ядра, что ведет к ослаблению NF-κB-зависимого сигнала и к уменьшению синтеза IκBa. В результате транслокация NF-κB в ядро вновь усиливается. Предполагается, что параметры колебаний, в частности их период и амплитуда, могут нести биологическую информацию, то есть определять параметры ответа клеток [25–27]. При этом колебания, возникающие в результате активации различных сигнальных путей, могут суммироваться, что тоже влияет на параметры ответа [24]. Неизвестно, может ли меха-

низм суммации колебаний приводить к формированию синергических эффектов NOD-TLR.

В предыдущей работе мы показали, что при сочетанной стимуляции макрофагов человека агонистами рецепторов NOD1 и TLR4 имеет место синергическое усиление экспрессии мРНК *TNF*, *IL6* и *IL1B*, причем синергический эффект формируется в период между 1 и 4 ч после добавления агонистов [28]. В настоящей работе изучены несколько ключевых показателей, характеризующих последовательные стадии активации системы NF-κB в макрофагах человека под действием агониста NOD1, агониста TLR4 и их сочетания. В частности, детально проанализирована кинетика деградации IκBa, транслокации факторов транскрипции p50, p65 и c-Rel в ядро, экспрессии мРНК *TNF*, *IL6* и *NFKBIA*. Показано, что вплоть до стадии транслокации NF-κB в ядро взаимодействие сигналов от рецепторов NOD1 и TLR4 не является синергическим. Однако на выходе из ядра формируется синергический ответ в виде взаимного усиления экспрессии мРНК цитокинов.

Материал и методы

Агонисты рецепторов NOD1 и TLR4. Агонист NOD1 – N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамил-мезодиаминопимелиновая кислота (M-триДАП) – был закуплен у Invivogen (США), липополисахарид (ЛПС) *E. coli* штамм O111:B4 – у Merck Millipore (США).

Получение и стимуляция макрофагов. Все кинетические эксперименты выполнены на культурах макрофагов от трех различных клинически здоровых доноров мужского пола в возрасте 20–50 лет. Исследования проводили согласно Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Исследование было одобрено локальным комитетом по этике. От всех доноров в отделении трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России были получены продукты лейкофереза. Макрофаги получали путем 6-суточного культивирования моноцитов, выделенных из продуктов лейкофереза, с рекомбинантным гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором человека (Miltenyi Biotec, Германия), как описано ранее [28, 29]. Стимуляцию макрофагов проводили в 24-луночных планшетах (SPL Life Sciences, Республика Корея) путем добавления M-триДАП (10 мкг/мл), ЛПС (10 нг/мл) и их сочетания. По данным предыдущих экспериментов, M-триДАП и ЛПС в указанных концентрациях оказывают выраженное синергическое действие на экспрессию цитокинов макрофагами [28]. Через необходимые промежутки времени собирали клеточные лизаты и супернатанты. Контролем служили нестимулированные клетки, инкубированные в течение того же времени.

Выделение ядерной и цитозольной фракции. Образцы ядерной и цитозольной фракции получали каждые 15 мин в течение 210 мин после добавления агонистов. К клеточному монослою, отмытому холодным

фосфатно-солевым буфером (ФСБ), добавляли гипотонический буфер, содержащий коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США). Планшет инкубировали на льду 12 мин, периодически покачивая. Добавляли Нонидет Р-40 (Amresco, США) до конечной концентрации 0,6 %, инкубировали еще 30 с, затем интенсивно пипетировали клеточные лизаты. Ядра осаждали путем центрифугирования при 2000 g, отбирали надосады (цитозольную фракцию) и добавляли к нему 1/5 объема 6-кратного буфера для образцов (10 % додецилсульфат натрия, 30 % глицерин, 0,6 М дитиотреитол, 0,012 % бромфеноловый синий, 0,3 М Трис, pH 6,8). Осадок ядер отмывали однократно гипотоническим буфером с ингибиторами протеаз (см. выше), после чего лизировали в 1-кратном буфере для образцов. Все образцы прогревали в течение 5 мин при 90 °С, после чего анализировали с помощью вестерн-блоттинга.

Вестерн-блоттинг. Методика подробно описана ранее [29]. Кроличьи поликлональные и моноклональные антитела (МкАт) к p65/RelA, c-Rel, p105/p50, p100/p52, IκBα и гистону H3 были закуплены у фирмы Cell Signaling Technologies (США), мышинные МкАт к α-тубулину (клон DM1A) – у фирмы Novus Biologicals (США). Гистон H3 и α-тубулин использовали как контроли загрузки, соответственно, для ядерной и цитозольной фракции; наряду с этим, отсутствие α-тубулина в ядерной фракции и отсутствие гистона H3 в цитозольной фракции служило критерием их чистоты.

Исследование экспрессии генов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) обратного транскрипта в реальном времени (ПЦР-РВ). Образцы собирали каждые 30 мин в течение 240 мин после добавления агонистов. Тотальную РНК выделяли с помощью наборов реактивов фирмы Jena Bioscience (Германия). Экспрессию мРНК *TNF*, *IL6* и *NFKB1A* в макрофагах анализировали с помощью ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green, как описано ранее [29]. Для детекции мРНК *NFKB1A* использовали следующие праймеры: 5'-AAGCAGCAGCTCACCGAG-3' (прямой) и 5'-ACAGCCAAGTGGAGTGGAG-3' (обратный). Относительную экспрессию (ОЭ) генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Референс-образцами, в которых ОЭ приравнивалась к 1, служили нестимулированные клетки данного донора в точке 30 мин. В качестве нормировочного гена использовали *GAPDH*.

Обработка данных и статистический анализ. Площади под кривыми «время–ответ» (AUC) вычисляли по методу трапеций. Площадь под кривой считали площадь между кривой ответа на агонист и кривой изменения данного показателя в нестимулированных клетках. Чтобы оценить взаимодействие двух агонистов, для каждого измеряемого или вычисляемого показателя рассчитывали индексы синергизма (ИС) по формуле:

$$ИС = \frac{\text{Ответ}_{\text{M-триДАП+ЛПС}}}{(\text{Ответ}_{\text{M-триДАП}} + \text{Ответ}_{\text{ЛПС}})}$$

Взаимодействие считали: а) синергическим при $ИС > 1$ с достоверностью $p < 0,05$ в *t*-тесте Стьюдента;

б) аддитивным при отсутствии достоверного отличия ИС от 1 (простая сумма эффектов агонистов); в) инфра-аддитивным, если эффект сочетания агонистов был меньше, чем сумма эффектов одиночных агонистов ($ИС < 1$ при $p < 0,05$), но не меньше, чем эффект любого из одиночных агонистов. Для статистического анализа использовали программы GraphPad Instat 3.06 и GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США).

Результаты

Кинетика экспрессии мРНК *TNF* и *IL6*

На первом этапе работы уточнили кинетику экспрессии мРНК *TNF* и *IL6* макрофагами в первые 4 ч стимуляции М-триДАП, ЛПС и их сочетанием. В присутствии М-триДАП и ЛПС уровень мРНК *TNF* достигал максимума, соответственно, через 120 ± 30 мин и 100 ± 17 мин после начала стимуляции, а в последующем снижался, оставаясь к исходу 4 ч значительно выше базальных значений (рис. 1А, табл. 1). Накопление мРНК *TNF* при стимуляции М-триДАП несколько запаздывало по сравнению с таковым при стимуляции ЛПС (см. рис. 1А). Вероятно, это обусловлено различиями в субклеточной локализации соответствующих рецепторов, из-за чего агонистам NOD1 требуется больше времени для достижения своего рецептора, чем агонистам TLR4. При сочетанной стимуляции уровни мРНК *TNF* вплоть до 90-й минуты не отличались от таковых при стимуляции ЛПС, но со 120-й мин становились достоверно выше, чем при стимуляции ЛПС (см. рис. 1А). Максимум экспрессии мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции достигался через 150 ± 30 мин, что достоверно позже, чем при стимуляции ЛПС (см. табл. 1). Далее вплоть до конца опыта уровень мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции находился на плато. Достоверный синергический эффект ($ИС > 1$ при $p < 0,05$) регистрировался со 150-й минуты включительно (рис. 1Б). Таким образом, особенность экспрессии мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4 состоит в продолжающемся накоплении мРНК *TNF* между 90 и 150-й минутами после начала стимуляции.

Схожие тенденции имели место и для мРНК *IL6* (рис. 1В, Г), с той разницей, что экспрессия мРНК *IL6* достигала максимальных значений позже, чем экспрессия мРНК *TNF* (см. табл. 1). Таким образом, подтверждены и уточнены сроки развития синергического эффекта NOD1-TLR4, описанные в предыдущей работе [28].

Кинетика транслокации белков семейства NF-κB в ядро

Белки NF-κB являются важнейшими регуляторами экспрессии *TNF* и *IL6* [30, 31]. Поскольку транслокация NF-κB в ядро может носить колебательный характер [24, 25], то уровни p65, c-Rel и p50 в ядрах макрофагов определяли с минимальными (15-минутными) интервалами в течение 3,5 ч после начала стимуляции. В исследуемом периоде, как правило, наблюдалась единствен-

Таблица 1. Время (в мин) от добавления агонистов до достижения максимальных (T_{max}) и минимальных (T_{min}) значений указанных показателей в макрофагах в зависимости от условий стимуляции

Показатель		1 М-триДАП	2 ЛПС	3 М-триДАП+ЛПС	P_{1-2}	P_{1-3}	P_{2-3}
мРНК <i>TNF</i>	T_{max}	120 ± 30	100 ± 17	150 ± 30	0,187	0,144	0,033
мРНК <i>IL6</i>	T_{max}	190 ± 46	180 ± 46	220 ± 17	0,415	0,174	0,165
p65 в ядре	T_{max}	75 ± 15	55 ± 9	40 ± 9	0,058	0,012	0,05
c-Rel в ядре	T_{max}	90 ± 26	50 ± 17	90 ± 30	0,045	0,500	0,058
p50 в ядре	T_{max}	110 ± 53	60 ± 15	75 ± 30	0,095	0,187	0,241
IκBα в цитоплазме	T_{min}	45 ± 26	25 ± 9	25 ± 9	0,137	0,137	0,500
	T_{max}	200 ± 17	210	175 ± 7	0,187	0,045	0,001
IκBα в ядре	T_{max}	205 ± 9	210	195 ± 15	0,187	0,187	0,079

ная «волна» ядерной транслокации p65, c-Rel и p50, независимо от вида стимула (рис. 2А, В, Д), в некоторых случаях – возможно, начало второй «волны», выходящей за временные рамки эксперимента (см. рис. 2В).

При стимуляции ЛПС уже на 15-й мин уровни p65, c-Rel и p50 в ядре были многократно повышены по сравнению с базальными (см. рис. 2А, В, Д). Как видно из табл. 1, максимальные уровни p65, c-Rel и p50 при стимуляции ЛПС достигались через 50–60 мин после начала стимуляции (на 40–50 мин раньше, чем достигался пик мРНК *TNF*) с последующим снижением, более вы-

раженным для p65 и c-Rel, менее выраженным – для p50 (рис. 2А, В, Д). При стимуляции М-триДАП накопление p65, c-Rel и p50 в ядре запаздывало по сравнению с таковым при стимуляции ЛПС (см. рис. 2А, В, Д; табл. 1), что согласуется с запаздыванием синтеза мРНК *TNF* (см. рис. 1А). При одновременном добавлении М-триДАП и ЛПС максимальный уровень p65 в ядре достигался достоверно раньше, чем при стимуляции М-триДАП или ЛПС по отдельности (см. табл. 1). Максимум уровня c-Rel при сочетанной стимуляции достигался в те же сроки, что и при стимуляции М-триДАП,

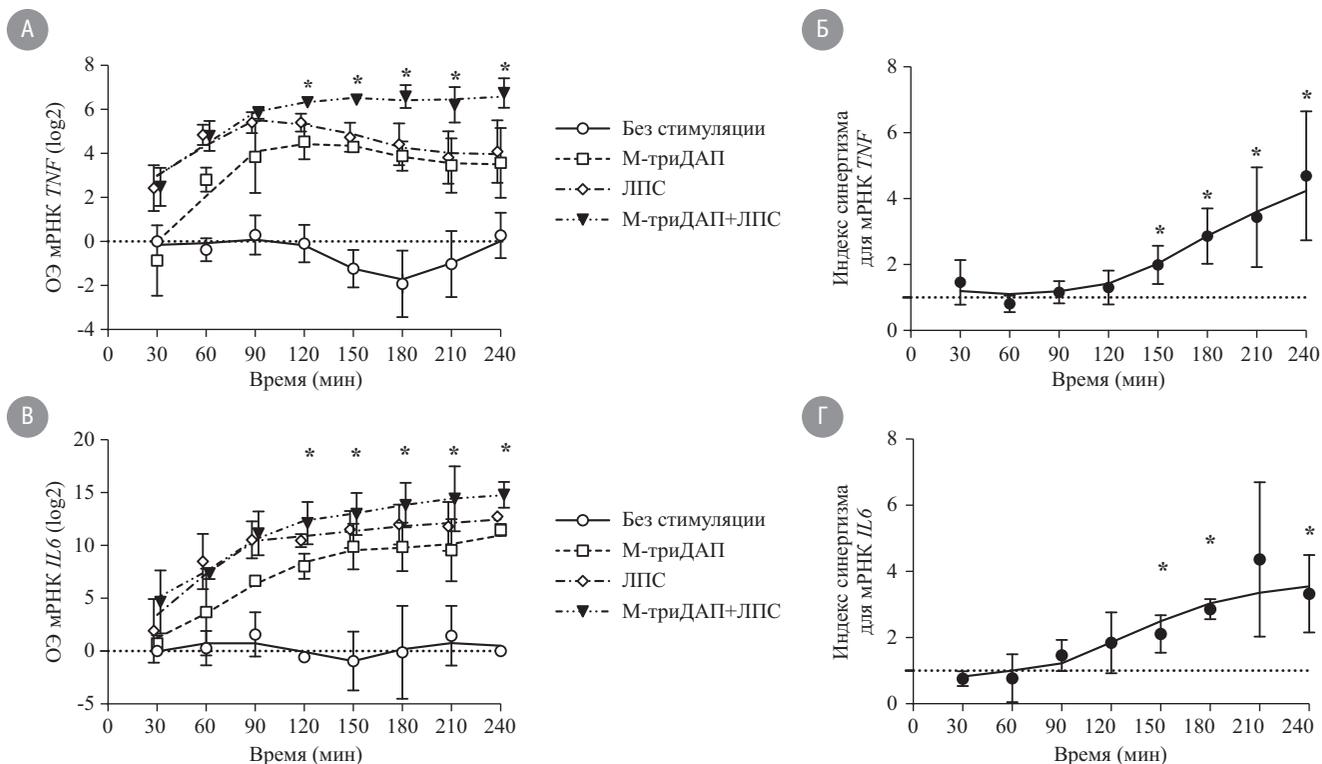


Рис. 1. Кинетика экспрессии мРНК *TNF* и *IL6* при стимуляции макрофагов М-триДАП, липополисахаридом (ЛПС) и их сочетанием

А, В – \log_2 -трансформированные значения относительной экспрессии (ОЭ) мРНК *TNF* (А) и *IL6* (В); Б и Г – соответствующие значения индексов синергизма; $M \pm \sigma$, $n = 3$; * значения достоверностей: А и В – $p < 0,05$ для сравнения клеток, стимулированных ЛПС и М-триДАП+ЛПС в соответствующих точках; Б и Г – $p < 0,05$ для отличия ИС от 1.

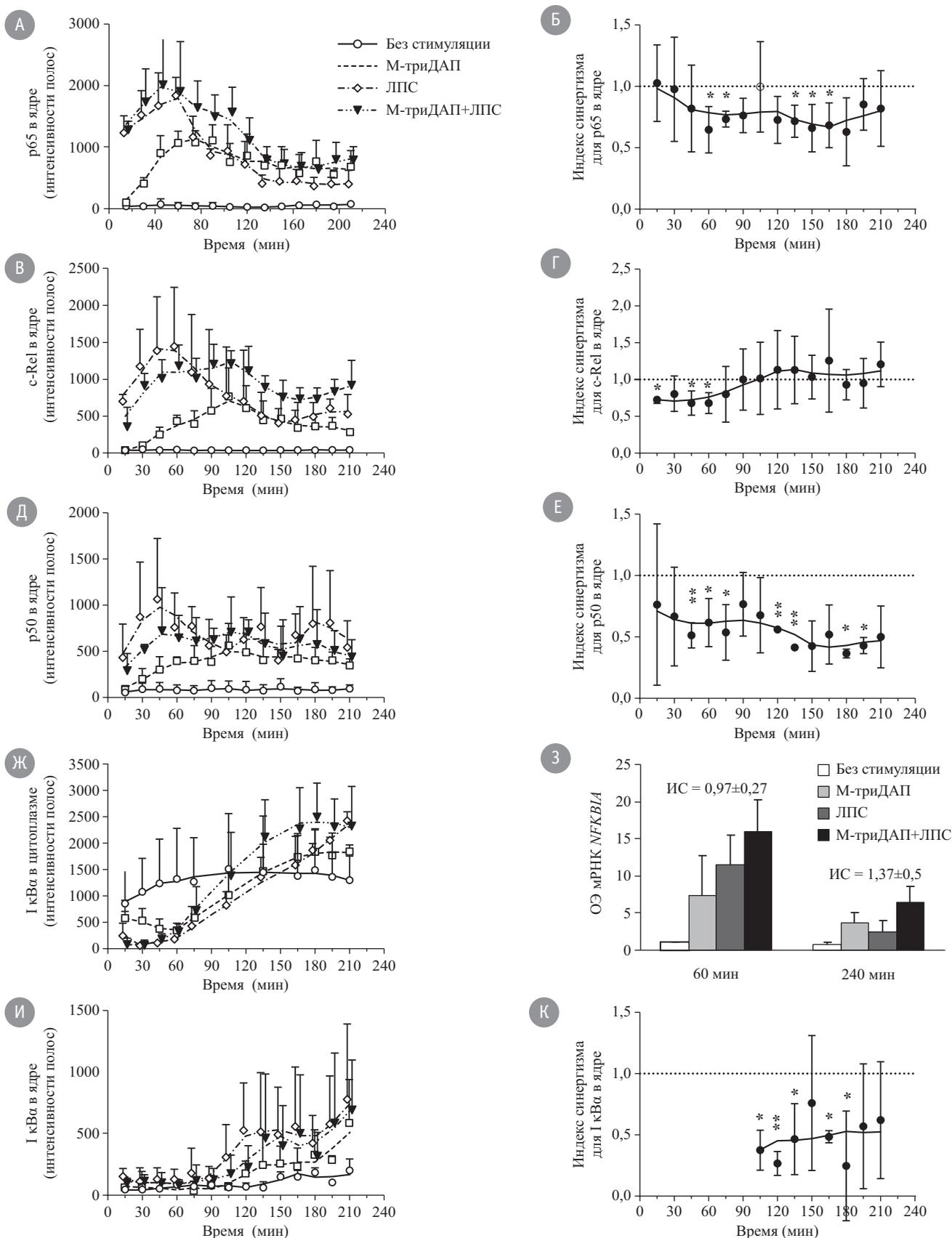


Рис. 2. Кинетика активации NF-κB-сигнального пути в макрофагах при стимуляции М-триДАП, липополисахаридом (ЛПС) и их сочетанием

А, В, Д – уровни p65, c-Rel и p50 в ядре; Б, Г, Е – соответствующие индексы синергизма; Ж, И – уровни IκBa в цитоплазме (Ж) и ядре (И); 3 – уровни мРНК NFKB1A при отдельной и сочетанной стимуляции; К – индексы синергизма для уровней IκBa в ядре; $M \pm \sigma$, $n = 3$; * $p < 0,05$ для отличия ИС от 1.

но раньше, чем при стимуляции ЛПС. Уровни p65, c-Rel и p50 в ядре при сочетанной стимуляции изменялись не-синергическим образом, поскольку ИС ни в одной точке достоверно не превышал 1 (рис. 2Б, Г, Е). В случае c-Rel при сочетанной стимуляции наблюдалась суммация ответов (ИС \approx 1), а в случае p65 и p50 – инфра-аддитивное взаимодействие (ИС < 1). При этом наиболее низкие ИС, близкие к 0,5, наблюдались для p50. Хотя в данной работе мы не ставили задачу определить ядерную транслокацию конкретных видов гомо- и гетеродимеров NF-кВ, данные по индексам синергизма позволяют предположить, что при сочетанной стимуляции имеет место относительный дефицит p50 в ядре и, следовательно, дефицит ингибиторных гомодимеров p50:p50. В исследованный промежуток времени мы не обнаружили в ядерной фракции макрофагов белка p100/p52 (данные не представлены), что говорит против участия неканонического пути активации NF-кВ в развитии синергического эффекта NOD1-TLR4.

Таким образом, на уровне ядерной транслокации NF-кВ синергический эффект совместной активации NOD1 и TLR4 отсутствует.

Кинетика деградации, ресинтеза и ядерной транслокации IкВa

Условием транслокации NF-кВ в ядро является протеасомная деградация белков семейства IкВ, в результате чего демаскируется сигнал ядерной локализации на молекулах NF-кВ. Белки IкВ обладают определенной селективностью в отношении конкретных белков NF-кВ: в частности IкВa связывается с наиболее широко представленными в клетке гетеродимерами p65:p50 [16]. При стимуляции ЛПС уже к 15-й минуте происходило почти полное исчезновение IкВa в цитоплазме (рис. 2Ж); минимальные уровни IкВa, составляющие < 5 % от исходных, наблюдались через 25 ± 9 мин после начала стимуляции. При стимуляции М-триДАП деградация IкВa была менее полной, а минимальный уровень IкВa наблюдался позже – через 45 ± 26 мин. При сочетанной стимуляции уровень IкВa достигал минимума в те же сроки, что и при стимуляции ЛПС – через 25 ± 9 мин (см. рис. 2Ж). Период сниженных уровней IкВa в цитозоле соответствовал периоду накопления белков NF-кВ в ядре (см. рис. 2А, В, Д).

После прохождения минимума начиналась фаза ресинтеза IкВa, причем уровни IкВa в цитоплазме, достигнутые к концу эксперимента, были в 1,5–2,5 раза выше

базальных (М-триДАП < ЛПС \approx М-триДАП+ЛПС) (см. рис. 2Ж). Ресинтез был обусловлен возрастанием экспрессии мРНК *NFKB1A* (рис. 2З). Интересно, что при сочетанной стимуляции эффекты двух агонистов на экспрессию мРНК *NFKB1A* суммировались, но синергического эффекта не наблюдалось (см. рис. 2З).

Вновь синтезируемый белок IкВa транспортируется в ядро, где вновь связывается с белками NF-кВ, способствуя их отделению от промоторов с последующим экспортом из ядра [21]. Уровни IкВa в ядре при различных видах стимуляции нарастали, начиная с 90-й минуты (рис. 2И). ИС при сочетанной стимуляции в этот период колебались около 0,5 (рис. 2К), что говорит о практическом отсутствии суммации ответов на М-триДАП и ЛПС.

Интегральные показатели транслокации NF-кВ и IкВa в ядро

Интегральным показателем, характеризующим накопление NF-кВ и IкВa в ядре за определенный промежуток времени, являются площади под кривыми. Мы рассчитали площади под кривыми в период формирования синергического эффекта (с 60-й по 180-ю минуту эксперимента). Из табл. 2 видно, что при сочетанной стимуляции имеет место более выраженное накопление p65, чем при стимуляции ЛПС, а также большее накопление c-Rel, чем при стимуляции М-триДАП. И наоборот, накопление IкВa в ядре при сочетанной стимуляции было достоверно меньшим, чем при стимуляции ЛПС (см. табл. 2). Накопление c-Rel в ядре при сочетанной стимуляции менялось аддитивно (ИС \approx 1), накопление p65, p50 и IкВa – инфра-аддитивно (ИС < 1). Обращает внимание ИС \leq 0,5 для IкВa, что говорит о взаимно ингибирующем эффекте М-триДАП и ЛПС на ядерную транслокацию IкВa.

Обсуждение

Хотя феномен синергического взаимодействия рецепторов врожденного иммунитета давно известен, его молекулярные механизмы до сих пор остаются неясными [9]. В данной работе установлен этап активации макрофага, на котором происходит формирование синергического эффекта NOD1-TLR4. Если судить по экспрессии мРНК *TNF*, то синергический эффект развивается в интервале 90–150 мин после одновременного добавления к макрофагам агонистов NOD1 и TLR4. В этом интервале времени при стимуляции каждым агонистом по отдельности экспрессия мРНК *TNF* выходит

Таблица 2. Нормализованные значения площадей под кривыми «время–ответ» в интервале 60–180 мин и соответствующие индексы синергизма (ИС)

Показатель	1 М-триДАП	2 ЛПС	3 М-триДАП+ЛПС	P_{1-3}	P_{2-3}	ИС	p (ИС)*
p65 в ядре	$1,16 \pm 0,5$	1	$1,19 \pm 0,11$	0,47	0,046 ↑	$0,57 \pm 0,16$	0,022 ↓
c-Rel в ядре	$0,79 \pm 0,46$	1	$1,8 \pm 0,98$	0,05 ↑	0,15	$0,97 \pm 0,36$	0,45
p50 в ядре	$0,75 \pm 0,43$	1	$0,88 \pm 0,18$	0,28	0,19	$0,51 \pm 0,07$	0,003 ↓
IкВa в ядре	$0,33 \pm 0,25$	1	$0,45 \pm 0,23$	0,35	0,026 ↓	$0,36 \pm 0,22$	0,019 ↓

Примечание. ЛПС – липополисахарид; * – достоверность отличия ИС от 1; $M \pm \sigma$, $n = 3$.

на плато и начинает снижаться, а при сочетанной стимуляции – продолжает нарастать, что говорит о продолжающейся транскрипции. После 150-й минуты экспрессия мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции сохраняется на плато, что может быть обусловлено продолжающейся транскрипцией и/или повышением стабильности мРНК.

В работе D.W. Abbott и соавт., выполненной на перевиваемых макрофагальных клеточных линиях, утверждалось, что синергическое взаимодействие NOD-рецепторов и TLR обусловлено синергической активацией киназного комплекса IKK [12]. Наши результаты не подтверждают эту концепцию: хотя активацию IKK мы напрямую не исследовали, результат этой активации – деградация IκBα и транслокация NF-κB в ядро – при сочетанной стимуляции не является синергическим. Для ядерной транслокации c-Rel мы наблюдали суммирование эффектов двух агонистов, для p65 и p50 эффект сочетания агонистов был инфра-аддитивным. Также, по данным нашей и других работ, при сочетанной стимуляции NOD и TLR отсутствует синергическая активация и других сигнальных путей, в частности MAP-киназного [11, 28]. Таким образом, каждый из двух рецепторов, видимо, активирует свою часть общего пула сигнальных белков в клетке. Как следствие, вплоть до поступления активационного сигнала в ядро взаимодействие сигналов от двух рецепторов носит несинергический характер. Не исключено, что некоторые компоненты сигнальных путей максимально активируются уже при стимуляции какого-либо одного рецептора; в таком случае будет отсутствовать даже суммация сигналов (что, возможно, наблюдалось в случае ядерной транслокации p50). Однако на выходе из ядра имеется синергическое усиление экспрессии мРНК *TNF* и *IL6*.

Может ли суммация сигналов от двух рецепторов, наблюдаемая на уровне ядерной транслокации NF-κB, приводить к синергическому эффекту на уровне транскрипции мРНК цитокинов? Как видно из динамики ИС (см. рис. 2Б, Г и табл. 2), при сочетанной стимуляции в ядре все же поддерживаются более высокие концентрации p65 и c-Rel, чем при стимуляции каждым агонистом по отдельности. Теоретически это может приводить к более полному и длительному занятию данными факторами транскрипции сайтов связывания в соответствующих промоторах, что может вести к более высокой экспрессии генов-мишеней NF-κB. Однако неочевидно, что эта экспрессия будет именно синергической. Интересно, что еще один исследованный нами NF-κB-зависимый ген – *NFKB1A* – при сочетанной стимуляции индуцировался несинергическим образом (см. рис. 23). Эти результаты позволяют предположить, что синергической индукции подвержена только часть

NF-κB-индуцибельных генов и что для этого необходимо связывание дополнительных факторов транскрипции с регуляторными сайтами таких генов.

Способствовать развитию синергического ответа может недостаток факторов негативной регуляции NF-κB-зависимого сигналинга. Возможным проявлением этого механизма является относительный дефицит IκBα в ядре при сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС. В то время как уровни c-Rel и p65 в ядре под действием сочетания агонистов меняются аддитивно или инфра-аддитивно (то есть становятся выше, чем при стимуляции каждым агонистом по отдельности), уровни IκBα при сочетанной стимуляции оказываются ниже, чем при стимуляции ЛПС (ИС ≤ 0,5; см. табл. 2). Следовательно, в период синергического нарастания экспрессии мРНК *TNF* и *IL6* возможен относительный дефицит ингибиторного белка IκBα в ядре, что может способствовать более стойкому взаимодействию белков NF-κB с промоторами генов цитокинов, результатом чего будет увеличение транскрипции соответствующих мРНК. Ответить на этот вопрос могут эксперименты по иммунопреципитации хроматина антителами к белкам NF-κB.

При сочетанной активации NOD1 и TLR4 меняется не только амплитуда, но и временные характеристики активации NF-κB. Так, мы наблюдали укорочение времени достижения пиковых концентраций p65 в ядре при сочетанной стимуляции по сравнению со стимуляцией ЛПС или М-триДАП по отдельности (см. рис. 2А и табл. 1). В этой связи интересна работа А.В. Багаева и соавт. [32], где показано, что скорость ядерной транслокации p65 при стимуляции макрофагов мыши ЛПС положительно коррелирует с преактивационным уровнем p65 в ядре. Поскольку NOD1 и TLR4 находятся в различных компартментах клетки, при одновременном добавлении агонистов активация NOD1 отстает от активации TLR4 (см. рис. 2А, В). Поэтому сигнал от NOD1 приходит в ядро в тот момент, когда там уже имеются повышенные уровни p65 вследствие активации TLR4, что может вести к ускорению NOD1-зависимой транслокации p65 и к более раннему достижению пиковой концентрации p65 в ядре. Однако вклад этого механизма в развитие синергического эффекта требует дальнейшего изучения.

Заключение

Таким образом, хотя NF-κB играет важнейшую роль в активации макрофагов под действием агонистов NOD1 и TLR4, синергическое усиление экспрессии цитокинов при одновременной активации этих рецепторов не объясняется синергической активацией NF-κB-зависимого сигнального пути.

Литература

1. Kim Y.G., Park J.H., Shaw M.H., Franchi L., Inohara N., Nunez G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2008; 28 (2): 246–57.
2. Chamailard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S., Saab L. et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bac-

terial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 2003; 4 (7): 702–7.

3. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*. 1998; 282 (5396): 2085–8.

4. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M. et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2459–70.
5. Пичугин А.В., Багаев А.В., Лебедева Е.С., Чулкина М., Атауллаханов Р.И. Синергическая продукция цитокинов дендритными клетками в ответ на одновременную активацию парами агонистов различных рецепторов врожденного иммунитета. *Иммунология* 2017; 38 (1): 118–23.
6. Wolfert M.A., Murray T.F., Boons G.J., Moore J.N. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (42): 39 179–86.
7. van Heel D.A., Ghosh S., Butler M., Hunt K., Foxwell B.M., Mengin-Lecreulx D. et al. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2471–6.
8. Murch O., Abdelrahman M., Kapoor A., Thiemermann C. Muramyl dipeptide enhances the response to endotoxin to cause multiple organ injury in the anesthetized rat. *Shock.* 2008; 29 (3): 388–94.
9. Pashenkov M.V., Murugina N.E., Budikhina A.S., Pinegin B.V. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. *J. Leukoc. Biol.* 2019; 105 (4): 669–80.
10. Tuhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D.V., Artemicheva N.M., Burdelya L.G., Shmarov M.M. et al. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF-kappaB, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 2013; 81 (10): 3855–64.
11. Tuhvatulin A.I., Dzharullaeva A.S., Tuhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M.M., Dolzhikova I.V. et al. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One.* 2016; 11 (5): e0155650.
12. Abbott D.W., Yang Y., Hutti J.E., Madhavarapu S., Kelliher M.A., Cantley L.C. Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27 (17): 6012–25.
13. Tsai W.H., Huang D.Y., Yu Y.H., Chen C.Y., Lin W.W. Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cell. Microbiol.* 2011; 13 (5): 717–30.
14. Лебедева Е.С., Багаев А.В., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. NF-кВ-, но не MAPK-сигнальный путь определяет синергический ответ макрофагов на одновременную активацию двух типов рецепторов TLR4+NOD2 или TLR9+NOD2. *Иммунология* 2017; 38 (2): 76–82.
15. Пичугин А.В., Багаев А.В., Лебедева Е.С., Чулкина М.М., Атауллаханов Р.И. Синергическая продукция цитокинов дендритными клетками в ответ на одновременную активацию парами агонистов различных рецепторов врожденного иммунитета. *Иммунология* 2017; 38 (2): 118–23.
16. Vallabhapurapu S., Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 693–733.
17. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jehanno M., Viala J. et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 2003; 300 (5625): 1584–7.
18. Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G.R., Inoue J., Chen Z.J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* 2001; 412 (6844): 346–51.
19. Kim J.Y., Omori E., Matsumoto K., Nunez G., Ninomiya-Tsuji J. TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (1): 137–44.
20. Hasegawa M., Fujimoto Y., Lucas P.C., Nakano H., Fukase K., Nunez G. et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *Embo J.* 2008; 27 (2): 373–83.
21. Mulero M.C., Wang V.Y., Huxford T., Ghosh G. Genome reading by the NF-kappaB transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (19): 9967–89.
22. Pan Q., Kravchenko V., Katz A., Huang S., Li M., Mathison J.C. et al. NF-kappa B-inducing kinase regulates selected gene expression in the Nod2 signaling pathway. *Infect. Immun.* 2006; 74 (4): 2121–7.
23. Coldey S.M., Rogazzo M., Collino M., Patel N.S., Thiemermann C. Inhibition of IkappaB kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse. *Dis. Model. Mech.* 2013; 6 (4): 1031–42.
24. Covert M.W., Leung T.H., Gaston J.E., Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science.* 2005; 309 (5742): 1854–7.
25. Tay S., Hughey J.J., Lee T.K., Lipniacki T., Quake S.R., Covert M.W. Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature.* 2010; 466 (7303): 267–71.
26. Purvis J.E., Lahav G. Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell.* 2013; 152 (5): 945–56.
27. Kellogg R.A., Tian C., Etzrodt M., Tay S. Cellular decision making by non-integrative processing of TLR inputs. *Cell Rep.* 2017; 19 (1): 125–35.
28. Муругина Н.Е., Будихина А.С., Максимчик П.В., Дагиль Ю.А., Баясова Л.С., Муругин В.В., Чкадуа Г.З., Пинегин Б.В., Пашенков М.В. Синергическое взаимодействие рецепторов NOD1 и TLR4 врожденного иммунитета: транскрипционные и метаболические аспекты. *Иммунология.* 2019; 40 (2): 9–16.
29. Pashenkov M.V., Balyasova L.S., Dagil Y.A., Pinegin B.V. The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production downstream of the NOD1 receptor. *J. Immunol.* 2017; 198 (4): 1638–48.
30. Shebzukhov Iu.V., Kuprash D.V. [Transcriptional regulation of TNF/LT locus in immune cells]. *Mol. Biol. (Mosk).* 2011; 45 (1): 56–67.
31. Luo Y., Zheng S.G. Hall of Fame among pro-inflammatory cytokines: interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front. Immunol.* 2016; 7: 604.
32. Bagaev A.V., Garaeva A.Y., Lebedeva E.S., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I., Ataulakhanov F.I. Elevated pre-activation basal level of nuclear NF-kappaB in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF-kappaB into the cell nucleus. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 4563.

■ References

1. Kim Y.G., Park J.H., Shaw M.H., Franchi L., Inohara N., Nunez G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity.* 2008; 28 (2): 246–57.
2. Chamailard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S., Saab L., et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 2003; 4 (7): 702–7.
3. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998; 282 (5396): 2085–8.
4. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M., et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2459–70.
5. Pichugin A.V., Bagaev A.V., Lebedeva E.S., Chulкина M., Ataulakhanov R.I. Synergistic cytokine production by murine dendritic cells in response to their simultaneous activation with pairs of agonists of different innate immune receptors. *Immunologia.* 2017; 38 (1): 118–23. (in Russian)
6. Wolfert M.A., Murray T.F., Boons G.J., Moore J.N. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (42): 39 179–86.
7. van Heel D.A., Ghosh S., Butler M., Hunt K., Foxwell B.M., Mengin-Lecreulx D., et al. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2471–6.
8. Murch O., Abdelrahman M., Kapoor A., Thiemermann C. Muramyl dipeptide enhances the response to endotoxin to cause multiple organ injury in the anesthetized rat. *Shock.* 2008; 29 (3): 388–94.
9. Pashenkov M.V., Murugina N.E., Budikhina A.S., Pinegin B.V. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. *J. Leukoc. Biol.* 2019; 105 (4): 669–80.

10. Tikhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D.V., Artemicheva N.M., Burdelya L.G., Shmarov M.M., et al. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF-kappaB, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 2013; 81 (10): 3855–64.
11. Tikhvatulin A.I., Dzharrullaeva A.S., Tikhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M.M., Dolzhikova I.V., et al. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One.* 2016; 11 (5): e0155650.
12. Abbott D.W., Yang Y., Hutt J.E., Madhavarapu S., Kelliher M.A., Cantley L.C. Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27 (17): 6012–25.
13. Tsai W.H., Huang D.Y., Yu Y.H., Chen C.Y., Lin W.W. Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cell. Microbiol.* 2011; 13 (5): 717–30.
14. Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I. NF-κB-, but not MAPK-signaling pathway determines synergistic response of macrophages to the simultaneous activation of two types receptors TLR4+NOD2 or TLR9+NOD2. *Immunologia* 2017; 38 (2): 76–82. (in Russian)
15. Pichugin A.V., Bagaev A.V., Lebedeva E.S., Chulkina M.M., Ataulakhanov R.I. Synergistic cytokine production by murine dendritic cells in response to their simultaneous activation with pairs of agonists of different innate immune receptors. *Immunologia* 2017; 38 (2): 118–23. (in Russian)
16. Vallabhapurapu S., Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 693–733.
17. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jehanno M., Viala J., et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 2003; 300 (5625): 1584–7.
18. Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G.R., Inoue J., Chen Z.J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* 2001; 412 (6844): 346–51.
19. Kim J.Y., Omori E., Matsumoto K., Nunez G., Ninomiya-Tsuji J. TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (1): 137–44.
20. Hasegawa M., Fujimoto Y., Lucas P.C., Nakano H., Fukase K., Nunez G., et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *Embo J.* 2008; 27 (2): 373–83.
21. Mulero M.C., Wang V.Y., Huxford T., Ghosh G. Genome reading by the NF-kappaB transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (19): 9967–89.
22. Pan Q., Kravchenko V., Katz A., Huang S., Li M., Mathison J.C., et al. NF-kappa B-inducing kinase regulates selected gene expression in the Nod2 signaling pathway. *Infect. Immun.* 2006; 74 (4): 2121–7.
23. Coldewey S.M., Rogazzo M., Collino M., Patel N.S., Thiemermann C. Inhibition of IkappaB kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse. *Dis. Model. Mech.* 2013; 6 (4): 1031–42.
24. Covert M.W., Leung T.H., Gaston J.E., Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science.* 2005; 309 (5742): 1854–7.
25. Tay S., Hughey J.J., Lee T.K., Lipniacki T., Quake S.R., Covert M.W. Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature.* 2010; 466 (7303): 267–71.
26. Purvis J.E., Lahav G. Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell.* 2013; 152 (5): 945–56.
27. Kellogg R.A., Tian C., Etzrodt M., Tay S. Cellular decision making by non-integrative processing of TLR inputs. *Cell Rep.* 2017; 19 (1): 125–35.
28. Murugina N.E., Budikhina A.S., Maximchik P.V., Dagil Y.A., Balyasova L.S., Murugin V.V., Chkadua G.Z., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. Synergistic interactions of NOD1 and TLR4 receptors of innate immunity: transcriptional and metabolic aspects. *Immunologia* 2019; 40 (2): 9–16. (in Russian)
29. Pashenkov M.V., Balyasova L.S., Dagil Y.A., Pinegin B.V. The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production downstream of the NOD1 receptor. *J. Immunol.* 2017; 198 (4): 1638–48.
30. Shebzukhov Iu.V., Kuprash D.V. [Transcriptional regulation of TNF/LT locus in immune cells]. *Mol. Biol. (Mosk).* 2011; 45 (1): 56–67.
31. Luo Y., Zheng S.G. Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front. Immunol.* 2016; 7: 604.
32. Bagaev A.V., Garaeva A.Y., Lebedeva E.S., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I., Ataulakhanov F.I. Elevated pre-activation basal level of nuclear NF-kappaB in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF-kappaB into the cell nucleus. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 4563.

© Коллектив авторов, 2020

Нестерова И.В.^{1,2}, Чудилова Г.А.¹, Ковалева С.В.¹, Русинова Т.В.¹,
Павленко В.Н.¹, Тараканов В.А.¹, Барова Н.К.¹, Малиновская В.В.³

Неоднозначное влияние рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ на нетрансформированный и трансформированный фенотип функционально значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов в эксперименте *in vitro*

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 350063, г. Краснодар, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Медицинский институт, 117198, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Современные исследования многофункциональности нейтрофильных гранулоцитов (НГ) свидетельствуют о наличии различных субпопуляций НГ, и каждая из них характеризуется своими фенотипическими и функциональными особенностями. Субпопуляции НГ обладают пластичностью и могут изменять свой фенотип в зависимости от микроокружения, оказывая позитивное, а при определенной трансформации и негативное (супрессирующее, повреждающее) воздействие на течение инфекционно-воспалительного процесса.

Целью настоящего исследования стало определение возможности экспериментального перепрограммирования трансформированного фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ у детей с малой гнойной инфекцией (МГИ) под влиянием субстанции рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (рИФН $\alpha 2b$) в системе *in vitro*.

Материал и методы. Исследованы образцы периферической крови (ПК) 12 детей обоего пола в возрасте 2–4 лет с острой малой гнойной инфекцией (МГИ) (группа исследования) и 7 условно здоровых детей, сопоставимых по полу и возрасту (группа сравнения). Методом проточной цитометрии проводили оценку численности субпопуляций НГ CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD62L⁺CD63⁻, CD62L⁺CD63⁺ с уточнением их фенотипа по плотности экспрессии каждой изучаемой мембранной молекулы по MFI. Исследовали фагоцитарную и микробицидную функции НГ у детей исследуемых групп. В системе *in vitro* ПК детей исследуемой группы и группы сравнения инкубировали в течение 1 ч при 37 °С с субстанцией рИФН $\alpha 2b$ в конечной концентрации 10⁻⁶ г/л, после чего контролировали особенности трансформации фенотипа субпопуляций НГ в обеих группах детей.

Результаты. Установлены варианты негативной трансформации фенотипов функционально значимых субпопуляций НГ: увеличение количества активированных CD62L^{dim}CD63^{mid}-НГ, CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ на фоне снижения уровня мажорной субпопуляции CD64⁺CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ и нарушения фагоцитарной и микробицидной функций НГ. Выявлена субпопуляция CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ, обладающая неадекватными провоспалительными свойствами. Уточнены возможности перепрограммирования фенотипа различных субпопуляций НГ при МГИ под влиянием рИФН $\alpha 2b$, что способствовало позитивной регуляции функциональной активности клеток.

Заключение. Получены новые данные о различных субпопуляциях НГ, негативной трансформации фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ при МГИ у детей. Установлены иммуномодулирующие эффекты рИФН $\alpha 2b$ на негативно трансформированный фенотип НГ при локальном гнойном процессе, проявляющийся в переключении НГ с провоспалительного фенотипа в противовоспалительный.

Для корреспонденции
Нестерова Ирина Вадимовна –
доктор медицинских наук,
профессор,
профессор кафедры
аллергологии и иммунологии
факультета непрерывного
медицинского образования
Медицинского института
ФГАОУ ВО РУДН,
Москва, Российская Федерация
E-mail: inesterova1@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-5339-4504>

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты; субпопуляции; фенотип; гнойная инфекции

Статья поступила 30.01.2020. **Принята в печать** 17.02.2020.

Для цитирования: Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Русинова Т.В., Павленко В.Н., Тараканов В.А., Барова Н.К., Малиновская В.В. Неоднозначное влияние рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ на нетрансформированный и трансформированный фенотип функционально значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов в эксперименте *in vitro*. Иммунология. 2020; 41 (2): 124–134. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-124-134

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации №АААА-А18-118122690053-0 и при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-415-230001p_a.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Nesterova I.V.^{1,2}, Chudilova G.A.¹, Kovaleva S.V.¹, Rusinova T.V.¹, Pavlenko V.N.¹, Tarakanov V.A.¹, Barova N.K.¹, Malinovskaya V.V.³

Contradictory effect of recombinant interferon $\alpha 2b$ on the non-transformed and transformed phenotypes of functionally significant subpopulations of neutrophilic granulocytes *in vitro*

¹ Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 350063, Krasnodar, Russian Federation

² Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Medical Institute, 117198, Moscow, Russian Federation

³ National Research Center of Epidemiology and microbiology named after N.F. Gamaleya, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Modern studies demonstrate the multifunctionality of neutrophil granulocytes (NG) and indicate the presence of various NG subpopulations. Each of the NG subpopulations has its own phenotypic and functional features. NG subpopulations reveal plasticity and can change their phenotype under influences of the microenvironment, exerting both positive and negative (suppressing, damaging) effects on the course of the infectious and inflammatory process.

The aim of the study was to determine the possibility of experimental reprogramming of the transformed phenotype of functionally significant NG subpopulations in children with acute small purulent infection (SPI) under the influence of the substance of recombinant interferon $\alpha 2b$ (rIFN $\alpha 2b$) in the *in vitro* system.

Material and methods. Samples of peripheral blood (PB) of 12 children of both sexes aged 2–4 years with acute small purulent infection (MGI) (the study group) and 7 conditionally healthy children, comparable in gender and age (the group of comparison), were studied. The number of NG subpopulations CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD62L⁺CD63⁻, CD62L⁺CD63⁺ was determined by flow cytometry, with refinement of their phenotype by the expression density of each studied membrane molecule according to MFI. Phagocytic and microbicidal functions of NG were studied in children of the both groups. PB samples from children of the study group and the group of comparison were incubated in the *in vitro* system for 1 h at 37 °C with a rIFN $\alpha 2b$ at a final concentration of 10⁻⁶ g/l, after which the features of transformation of the phenotype of NG subpopulations in both groups of children were monitored.

Results. Variants of negative transformation of phenotypes of functionally significant NG subpopulations were found: an increase in the number of activated CD62L^{dim}CD63^{mid}-NG, CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-NG against the background of a decrease in the level of the major subpopulation CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright} and violations of phagocytic and microbicidal functions of NG. A subpopulation of CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-NG with inadequate pro-inflammatory properties was identified. It was shown the possibility

For correspondence

Irina V. Nesterova – MD, Professor,
Professor of the Department
of Allergology and Immunology
of Faculty of Continuing
Medical Education
of the Medical Institute,
Peoples' Friendship University of Russia
(RUDN University),
Moscow, Russian Federation
E-mail: inesterova1@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-5339-4504>

of phenotype reprogramming of various NG subpopulations in study group with SPI under the influence of rIFN α 2b, which contributed to the positive regulation of the functional cell activity.

Conclusion. Our study demonstrated negative transformation of the phenotype of functionally significant NG subpopulations in children with SPI. The immunomodulatory effects of rIFN α 2b were shown on the negatively transformed NG phenotype in study group with the local purulent process. Those effects were manifested in the switch of NG phenotype from the pro-inflammatory to the anti-inflammatory one.

Keywords: neutrophilic granulocytes; subset; phenotype; purulent infection

Received 30.01.2020. **Accepted** 17.02.2020.

For citation: Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Rusinova T.V., Pavlenko V.N., Tarakanov V.A., Barova N.K., Malinovskaya V.V. Contradictory effect of recombinant interferon α 2b on the non-transformed and transformed phenotypes of functionally significant subpopulations of neutrophilic granulocytes *in vitro*. Immunologiya. 2020; 41 (2): 124–34. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-124-134 (in Russian)

Funding. The study was carried out as part of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation No. АААА-А18-118122690053-0 and was partially funded by RFBR according to the research project №19-415-230001p_a.

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

Введение

Современные фундаментальные исследования убедительно свидетельствуют о том, что нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются ключевыми эффекторными и регуляторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета, и играют решающую роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний [1–3]. Отсутствие адекватного реагирования или блокада функций НГ приводит к развитию нетипично протекающих острых, хронических и вялотекущих инфекционно-воспалительных заболеваний, тяжело протекающих инфекционных болезней и гнойно-воспалительных процессов, не отвечающих на традиционную терапию. В то же время гиперактивация НГ оказывает повреждающее воздействие на клетки и ткани при аутоиммунных заболеваниях, сепсисе, остром гематогенном остеомиелите, деструктивной пневмонии, хронических заболеваниях, иммунозависимых процессах [3–6]. Сегодня уже не вызывает сомнений, что НГ пластичны и способны изменять свои свойства под влиянием различных иммунотропных субстанций, трансформируясь в субпопуляции как с позитивным, так и с негативным – супрессирующим – потенциалом [7–13]. Известно, что различные фенотипические профили и уровень оснащённости поверхностными рецепторами связаны с морфологическими особенностями и определяют функциональный потенциал НГ – цитокинопродукцию, трансэндотелиальную миграцию, внутриклеточный и внеклеточный киллинг, образование NET [5, 14–19]. Продемонстрировано существование достаточно большого количества субпопуляций НГ, обладающих различными возможностями. НГ, получающие комплексные цитокиновые влияния, не только приобретают новые черты, но и проходят различные стадии активации и дифференцировки, экспрессируя при этом антигены МНС класса II, CD80, CD86, ICAM-1, LFA-1 [20]. В наших более ранних работах были идентифицированы следу-

ющие субпопуляции НГ: регуляторные; супрессорные; провоспалительные – инициирующие воспалительную реакцию; воспалительные с позитивным микробицидным потенциалом (антибактериальным, противовирусным, противогрибковым); воспалительные с негативным цитотоксическим потенциалом – «агрессивные»; противовоспалительные – регулирующие регрессию воспаления; противоопухолевые – TAN1; проопухолевые – TAN2, гибридные [21]. Большую диагностическую и прогностическую значимость имеют выявленные нами варианты ремоделирования фенотипа НГ, одновременно экспрессирующих CD64, CD32, CD11b и CD16 – рецепторы, функционально значимые при инфекционно-воспалительных заболеваниях, в том числе у новорожденных различного гестационного возраста [22–23], у пациентов с неопластическими процессами [23–24]. Активация CD64-, CD32-, CD16- и CD11b-рецепторов приводит к таким сложным процессам клеточной активации и элиминации, как фагоцитоз, экзоцитоз внутриклеточных гранул, продуцирование активных форм кислорода (ROS), антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), высвобождение внеклеточных ловушек НГ (NETs), а также дополнительным ответам, в том числе хемотаксической миграции или выделению хемокинов и цитокинов [25, 26].

Низкоаффинные CD16(Fc γ RIII) и CD32(Fc γ RII) играют важную роль во взаимодействии НГ с иммунными комплексами [27]. Fc γ RIII осуществляют начальный контакт и связывание иммунных комплексов *in vivo* [28], затем происходит полная активация НГ посредством синергического лигирования как Fc γ RIIA, так и Fc γ RIII. Чтобы получить полное ингибирование ответов НГ необходимо удалить или заблокировать оба рецептора. Высокоаффинный рецептор CD64 (Fc γ RI), способен связывать IgG1, IgG3 и IgG4 человека в мономерной форме на ранних стадиях гранулопоэза, а на зрелых НГ в норме он представлен на очень низком

уровне (~1400 рецепторов на клетку). Экспрессия рецептора CD64 на поверхности НГ индуцируется в ответ на взаимодействие с компонентами микробной стенки (LPS), компонентами комплемента и некоторыми цитокинами: ИФН- γ , ФНО α , ИЛ8, ИЛ12 и т.д., повышение уровня которых сопровождается развитием бактериальных инфекций [26–28].

CD11b (рецептор комплемента 3, CR3) связывает большое количество физиологических лигандов и участвует в многочисленных функциях НГ. Функционально CD11b (в присутствии субъединицы CD18) регулирует адгезию и миграцию НГ, является рецептором для C3bi, опосредующим поглощение и фагоцитоз и воспалительный ответ. Использование антител против CD11b позволило идентифицировать CD11b в качестве рецептора γ -цепи фибриногена, фактора X и ICAM1, что доказывает участие в клеточно-опосредованной цитотоксичности, хемотаксисе и фагоцитозе [29].

Так как регуляция процессов адгезии, миграции и хемотаксиса играет важную роль в активации и полноценном функционировании НГ, оценка уровня экспрессии CD62L и CD63 на CD16⁺-НГ позволяет получить представление о способности клетки к роллингу, миграции и готовности включения микробицидного арсенала. Рецептор адгезии CD62L отвечает за миграцию НГ к очагу воспаления. При этом CD63 играют роль белков-посредников при передаче сигналов, выполняя важную регуляторную функцию, влияя на развитие НГ, их активацию, рост и подвижность. Экспрессия CD63 на мембране НГ – кратковременный сигнал активации, оказывающий регуляторное воздействие на адгезионную активность CD11/CD18. Кроме того, CD63 является маркером азурофильных гранул, по уровню экспрессии которого можно судить об интенсивности активности миелопероксидазы (МПО).

Дефекты функционирования НГ сопровождаются различными гнойно-воспалительными заболеваниями, имеющими упорно-рецидивирующее течение. Проблема нетипично протекающей малой гнойной инфекции (МГИ) мягких тканей весьма актуальна в связи с ростом гнойно-воспалительных заболеваний и послеоперационных осложнений [30–33]. Одна из основных особенностей МГИ, включая флегмоны и абсцессы, – расширение спектра возбудителей, относящихся к условно-патогенным микроорганизмам, что в первую очередь связано со снижением иммунной реактивности организма и негативными изменениями в составе симбионтной микрофлоры кожи в условиях ухудшающейся экологии и селективного воздействия антибиотиков [34]. Прогрессированию воспаления при МГИ способствует снижение общей резистентности организма и особенно функций НГ [35]. Для решения данной проблемы необходимо разработать методы контролируемой коррекции в системе НГ при инфекционно-воспалительных заболеваниях, в том числе МГИ, с помощью иммунотропных препаратов различной природы, так как субпопуляции НГ демонстрируют высокую степень пластичности

и функциональную гетерогенность в зависимости от особенностей течения патологического сценария иммунного ответа.

Цель исследования – выявить возможности экспериментального перепрограммирования трансформированного фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ у детей с МГИ под влиянием субстанции рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (рИФН $\alpha 2b$) в системе *in vitro*.

Материал и методы

Для изучения возможности модулирования трансформированного фенотипа НГ исследованы образцы периферической крови (ПК) детей 2–4 лет ($n = 12$) с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями (абсцессы, флегмоны – МГИ) до хирургического вмешательства (группа исследования) и 7 условно здоровых детей, сопоставимых по полу и возрасту (группа сравнения).

Методом проточной цитометрии (FC500, Beckman Coulter, США) с МкАт (Beckman Coulter International S.A., Франция) тестировали одномоментное несение функционально значимых мембранных рецепторов CD16, CD64, CD32, CD11b и CD62L, CD63. При этом проводили количественную оценку субпопуляций НГ CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD62L⁺CD63⁺, CD62L⁺CD63⁺ с уточнением плотности экспрессии каждой изучаемой мембранной молекулы на поверхности НГ по MFI. Такой подход позволил выявлять особенности фенотипа изучаемых функционально значимых субпопуляций НГ и контролировать изменения динамики экспрессии каждой мембранной молекулы.

Кроме того, у исследуемых групп тестировали фагоцитарную и микробицидную функции НГ. Оценивали содержание активно фагоцитирующих НГ – (%ФАН), объем захваченного бактериального материала – фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ); активность переваривания – по проценту и индексу переваривания (%П; ИП). Активность NADPH-оксидазы определялась в нагрузочных тестах в системе *in vitro* с *St.aureus* (NBT-тест). В зависимости от уровня спонтанной и стимулированной активности определяли средний цитохимический индекс – СЦИ, рассчитывали коэффициент мобилизации (КМ) – СЦИст/СЦИсп для NADPH-оксидаз [22].

С целью уточнения возможности перепрограммирования фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ и коррекции их фагоцитарной и микробицидной функций ПК детей исследуемой группы (дети с МГИ) и группы сравнения инкубировали в течение 1 ч при 37 °С с рИФН $\alpha 2b$ в конечной концентрации 10⁻⁶ г/л, которая была любезно предоставлена ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России. После инкубации контролировали особенности трансформации фенотипа исследуемых субпопуляций НГ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ

Microsoft Excel 2016, StatPlus 2009 с применением непараметрических тестов Вилкоксона и Манна–Уитни. Результаты представляли в виде медианы (верхний и нижний квартиль) – $Me (Q_1; Q_3)$. Различия определяли значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ полученных результатов позволил выявить неадекватное реагирование НГ ПК на локальный гнойный инфекционный процесс у детей с МГИ. Так, в группе исследования относительное количество НГ в остром периоде МГИ достоверно не отличалось от такового в группе сравнения 39,5 (27,55; 47,5)% против 41,0 (37,0; 47,0)% ($p > 0,05$). На этом фоне уровень лейкоцитов повысился незначительно и составил лишь 8,75 (8,11; 9,23) $\times 10^9/\text{л}$ против 7,25 (6,67; 8,25) $\times 10^9/\text{л}$ ($p > 0,05$) в группе сравнения (рис. 1).

При проведении тестирования поверхностных мембранных рецепторов НГ CD62L и CD63 было показано, что у условно здоровых детей 2–4 лет 89,45 (81,48; 96,8)% НГ представлены субпопуляцией с фенотипом CD62L^{mid}CD63⁻ с плотностью экспрессии рецепторов по MFI: CD62L – 7,08 (5,44; 11,3) и отсутствием молекул CD63 на поверхностной мембране НГ. Другая субпопуляция НГ обнаруживалась у 7,55 (0,31; 8,65)% условно здоровых детей и характеризовалась другим фенотипом – CD62L^{dim}CD63^{mid}, имеющим более низкую плотность рецепторов CD62L – 4,55 (3,54; 8,85), и наличием молекулы CD63 средней плотности экспрессии по MFI – 2,19 (1,68; 3,20) (табл. 1).

Культивирование НГ условно здоровых детей с рИФНа2b, связывающимся с рецептором IFN α/β R на поверхностной мембране НГ, позволило выявить особенности его влияния на трансформацию фенотипа субпопуляций CD62L^{mid}CD63⁻-НГ и CD62L^{dim}CD63^{mid}-НГ. Значительно изменилась субпопуляция CD62L^{mid}CD63⁻-НГ, которая трансформировалась в CD62L^{bright}CD63⁻-НГ. Количество НГ этой субпопуляции, несущей только молекулу CD62L, уменьшилось с 89,45 (81,48; 96,8) до 65,95 (39,93; 80,8) ($p < 0,05$), но при этом увеличилась плотность экспрессии (см. табл. 1). Увеличение уровня экспрессии молекул CD62L на мембране НГ необходимо

для усиления процессов миграции, в том числе к очагу воспаления.

В системе *in vitro* рИФНа2b способствовал значительной трансформации фенотипа субпопуляции CD62L^{dim}CD63^{mid}-НГ, которая у условно здоровых детей встречалась в 7,55 (0,31; 8,65)% случаев. Под влиянием рИФНа2b отмечено увеличение до 32,96 (11,59; 51,7)% ($p < 0,05$) количества НГ с фенотипом CD62L^{bright}CD63^{dim}-НГ, с высоким (в 2,2 раза) MFI CD62L-рецептора. В тоже время выявлена тенденция к умеренному снижению уровня мембранной экспрессии молекулы CD63, что, вероятно, позволяет предохранить НГ от усиления преждевременной спонтанной дегрануляции (см. табл. 1).

Сравнительный анализ субпопуляций CD62L^{mid}CD63⁻-НГ и CD62L^{dim}CD63^{mid}-НГ у условно здоровых детей и у детей с МГИ выявил значительное (в 3,1 раза) уменьшение количества НГ субпопуляции CD62L^{mid}CD63⁻ с 89,45 (81,48; 96,8)% в группе сравнения до 28,8 (2,2; 57,8)% у детей с МГИ. В тоже время при МГИ в 8,5 раза увеличилось количество НГ субпопуляции CD62L^{dim}CD63^{mid} по сравнению с таковым в группе условно здоровых детей, соответственно с 7,55 (0,31; 8,65) до 63,95 (17,25; 74,1) ($p < 0,05$) (табл. 2).

При этом проявилась пластичность НГ, о чем свидетельствует факт самостоятельного перепрограммирования под влиянием бактериальных АГ у пациентов с МГИ 35,5% НГ субпопуляции CD62L^{mid}CD63⁻ в субпопуляцию с фенотипом CD62L^{dim}CD63^{mid}, то есть в ПК пациентов с МГИ появилось большое количество НГ субпопуляции CD62L^{dim}CD63^{mid}, где достаточно высока экспрессия рецепторов CD63, активирующих процессы дегрануляции НГ, что имеет существенное значение для реализации процессов завершенности фагоцитоза при МГИ. При этом уровень экспрессии поверхностных рецепторов CD62L и CD63, определяемый в субпопуляциях CD62L^{mid}CD63⁻-НГ и CD62L^{dim}CD63^{mid}-НГ, у пациентов с МГИ статистически значимо не отличался от показателей группы сравнения (см. табл. 2).

Установлено отсутствие влияния рИФНа2b в системе *in vitro* на трансформированный фенотип субпопуляций CD62L^{mid}CD63⁻-НГ и CD62L^{dim}CD63^{mid}-НГ у пациентов с МГИ в отличие от позитивных эффектов рИФНа2b, выявленных у условно здоровых детей (рис. 2).

Анализ данных, полученных при изучении НГ, экспрессирующих рецепторы CD64, CD16, CD32, CD11b, продемонстрировал, что у условно здоровых детей НГ ПК представлены двумя субпопуляциями: мажорной – CD64⁺CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright} и минорной – CD64^{mid}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{mid}. Мажорная субпопуляция CD64⁺CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright} присутствует в 97,98 (96,88; 98,74)% случаев, в то время как минорная выявляется лишь у 1,30 (0,18; 0,35)% условно здоровых детей. Мажорная субпопуляция характеризуется различным уровнем плотности экспрессии каждого из оцениваемых рецепторов: CD64 – нет экспрессии, MFI CD16 – 129,50 (115,75; 131,75), MFI CD11b – 19,40

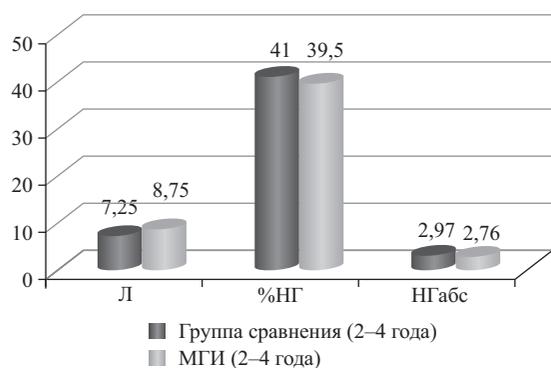


Рис. 1. Содержание общего числа лейкоцитов (Л) и количества НГ периферической крови у детей 2–4 лет с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей

Таблица 1. Влияние рИФНа $2b$ на фенотип субпопуляций CD62L^{mid}CD63-НГ и CD62L^{dim}CD63^{mid}НГ условно здоровых детей, Me (Q₁; Q₃)

НГ группы сравнения				
CD62L ^{mid} CD63-НГ, %	MFI CD62L	CD62L ^{dim} CD63 ^{mid} НГ, %	MFI CD62L	MFI CD63
89,45 (81,48; 96,8)	7,08 (5,44; 11,3)	7,55 (0,31; 8,65)	4,55 (3,54; 8,85)	2,19 (1,68; 3,20)
НГ группы сравнения + рИФНа $2b$				
CD62L ^{bright} CD63-НГ, %	MFI CD62L	CD62L ^{bright} CD63 ^{dim} НГ, %	MFI CD62L	MFI CD63
65,95* (39,93; 80,8)	10,99 (5,49; 15,5)	32,96* (11,59; 51,7)	9,85 (4,93; 14,3)	1,85 (1,64; 1,96)

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: * – различия показателей по сравнению с фоновыми значениями условно здоровых детей $p < 0,05$; ^ – различия показателей между исследуемыми группами с нагрузками.

(16,66; 20,93) и MFI CD32 – 5,73 (4,76; 6,11). Минорная субпопуляция CD64^{mid}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{mid}, в отличие от мажорной, характеризуется появлением активационного маркера CD64, с MFI 7,92 (5,25; 12,20). При этом отмечаются более низкие значения MFI CD16 – 79,43 (65,13; 79,62) (в 1,8 раза меньше) ($p < 0,05$) и CD11b – 15,39 (4,87; 25,90) ($p > 0,05$), а MFI CD32 составил 5,50 (5,2; 6,31) и практически не отличался от экспрессии в мажорной субпопуляции ($p > 0,05$) (табл. 3).

При изучении влияния рИФНа $2b$ на фенотип мажорной субпопуляции CD64^{bright}CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ условно здоровых детей (группа сравнения) в эксперименте *in vitro* установлено, что на фоне сохраняющегося ее количественного состава происходит значительная трансформация фенотипа CD64^{bright}CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}. Наблюдается тенденция к увеличению плотности экспрессии CD16 ($p > 0,05$), происходит статистически значимое увеличение MFI CD32 ($p < 0,05$) и снижение MFI CD11b ($p > 0,05$). Эти изменения свидетельствуют о трансформации мажорной субпопуляции в сторону фенотипа CD64^{bright}CD16^{bright}CD32^{mid}CD11b^{mid} (см. табл. 3).

Под влиянием рИФНа $2b$ не менялось количество НГ минорной субпопуляции CD64^{mid}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{mid}-НГ ($p > 0,05$). При этом выявлено значимое усиление экспрессии молекул CD64 ($p < 0,05$) и CD11b ($p < 0,05$), наблюдалась тенденция к умеренному уве-

личению MFI CD32 ($p > 0,05$) и значительное снижение (в 9,15 раз) плотности экспрессируемых молекул CD16 ($p < 0,05$). Эти изменения свидетельствовали о перестройки под влиянием рИФНа $2b$ фенотипа покоящейся минорной субпопуляции CD64^{mid}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{mid}-НГ в сторону активного воспалительного фенотипа CD64^{bright}CD16^{dim}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ с выраженными протективными свойствами, но с минимизацией цитотоксических свойств, о чем свидетельствует значительное снижение экспрессии молекул CD16 на поверхностной мембране НГ (см. табл. 3).

У пациентов с МГИ отмечались снижение количества НГ субпопуляции CD64^{bright}CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright} до 86,45 (80,49; 96,08)% против 97,98 (96,88; 98,74)% НГ в группе сравнения ($p < 0,05$). При этом отмечалась и трансформация фенотипа CD64^{bright}CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ, выявляемого у условно здоровых детей, в фенотип CD64^{mid}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}, характерный для НГ при МГИ. Отмечалось значимое снижение плотности экспрессии CD16 в 1,58 раз до 81,5 (64,90; 97,3) против 129,50 (115,75; 131,75) в группе сравнения ($p < 0,05$), выявлена тенденция к повышению MFI CD11b ($p > 0,05$), при уровне экспрессии CD32, не отличающемся от группы сравнения ($p > 0,05$).

Отмечено, что у детей группы исследования с МГИ на фоне появления субпопуляции CD64^{mid}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ с трансформирован-

Таблица 2. Влияние рИФНа $2b$ на трансформацию фенотипа субпопуляций CD62L^{mid}CD63-НГ и CD62L^{dim}CD63^{mid}-НГ детей с МГИ в эксперименте *in vitro*, Me (Q₁; Q₃)

Группа сравнения (условно здоровые дети)				
CD62L ^{mid} CD63-НГ, %	MFI CD62L	CD62L ^{dim} CD63 ^{mid} -НГ, %	MFI CD62L	MFI CD63
89,45 (81,48; 96,8)	7,08 (5,44; 11,3)	7,55 (0,31; 8,65)	4,55 (3,54; 8,85)	2,19 (1,68; 3,20)
Группа исследования: НГ детей с МГИ				
CD62L ^{mid} CD63-НГ, %	MFI CD62L	CD62L ^{dim} CD63 ^{mid} -НГ, %	MFI CD62L	MFI CD63
28,8* (6,63; 62,75)	5,72 (4,92; 8,77)	63,95* (17,25; 74,1)	5,64 (4,38; 6,77)	2,22 (1,83; 2,63)
МГИ + рИФНа $2b$				
CD62L ^{mid} CD63-НГ, %	MFI CD62L	CD62L ^{dim} CD63 ^{mid} -НГ, %	MFI CD62L	MFI CD63
25,45* (2,20; 57,8)	5,8 (5,04; 9,3)	69,0* (36,99; 79,1)	6,59 (4,92; 8,83)	2,08 (1,75; 3,54)

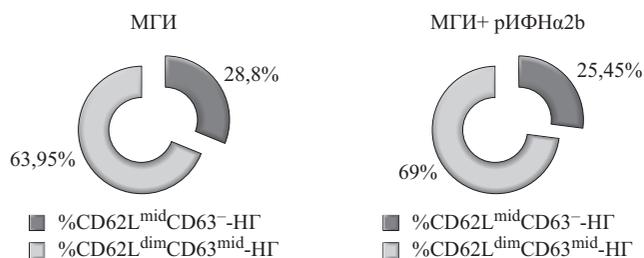


Рис. 2. Влияние рИФНа2b на фенотип субпопуляций CD62L^{mid}CD63⁻-НГ и CD62L^{dim}CD63^{mid}-НГ у детей с МГИ

ным фенотипом наблюдается значительное увеличение %НГ субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁻ – в 11,1 раза до 14,45 (5,58; 15,71)% против 1,30 (0,18; 0,35)% по сравнению с показателями группы условно здоровых детей. Также при МГИ установлена трансформация фенотипа этой субпопуляции в CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ в отличие от фенотипа CD64^{mid}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{mid}-НГ в группе сравнения. Субпопуляция с фенотипом CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ у пациентов с МГИ имела одинаковую экспрессию рецепторов CD16, CD32, CD11b по сравнению с мажорной субпопуляцией CD64⁺CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ при МГИ (табл. 4).

Следует отметить, что несмотря на значительное увеличение в 11,1 раза количества НГ субпопуляции CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ у детей с МГИ, уровни экспрессии изучаемых рецепторов отличались от значений, регистрируемых в группе условно здоровых детей. Так, показана более низкая, в 2,3 раза меньше, плотность экспрессии молекул CD64 – 3,36 (2,19; 4,72) против 7,92 (5,25; 12,20) в группе сравнения ($p < 0,05$), в то время как MFI CD11b была в 1,6 раза выше – 24,6 (17,68; 37,12) против 15,39 (14,87; 15,90) в группе сравнения ($p < 0,05$), при этом уровни MFI

мембранных молекул CD32 и CD16 статистически значимо не отличались от таковых в группе сравнения ($p_1 > 0,05$; $p_2 > 0,05$) (см. табл. 4).

Значимое увеличение субпопуляции CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ при МГИ, с одной стороны, свидетельствует о появлении большего количества НГ, несущих активационную молекулу CD64, являющуюся маркером бактериальной инфекции. С другой стороны, эта субпопуляция характеризуется повышенной экспрессией молекул адгезии CD11b, влияющей на запуск процессов фагоцитоза, но при неменяющемся уровне экспрессии CD32 и CD16. Полагаем, что субпопуляция CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ является воспалительной субпопуляцией (НГ1), обладающей провоспалительными свойствами и участвующей в иницировании процесса гнойного воспаления. Ее увеличение на фоне манифестирования МГИ у детей может свидетельствовать о неполноценности эффекторных функций НГ, не предотвративших возникновение гнойного процесса, и может расцениваться как прогностически неблагоприятный признак.

Культивирование НГ ПК детей с МГИ в системе *in vitro* с рИФНа2b позволило выявить модулирующие эффекты рИФНа2b, проявляющиеся в снижении в 4,7 раз количества НГ минорной субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁻-НГ на фоне увеличения субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺-НГ (см. табл. 4). При этом следует отметить, что рИФНа2b приводит к незначительному повышению уровня экспрессии CD16 ($p > 0,05$) и статистически значимому снижению MFI CD11b ($p < 0,05$) мажорной субпопуляции CD64⁺CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ. В минорной субпопуляции под влиянием рИФНа2b происходит изменение фенотипа с CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ на CD64^{mid}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{mid}-НГ и выявляется умеренная тенденция повышения уровня экспрессии CD64

Таблица 3. Влияние рИФНа2b в эксперименте *in vitro* на фенотип субпопуляций CD64⁺CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ и CD64^{mid}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{mid}-НГ условно здоровых детей, Me (Q₁; Q₃)

%CD64 ⁺ CD16 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺					
	НГ, %	CD64 ⁺ CD16 ^{bright} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}			
		MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b	
Группа сравнения	97,98 (96,88; 98,74)	129,50 (115,7; 131,75)	5,73 (4,76; 6,11)	19,40 (16,66; 20,93)	
Группа сравнения +рИФНа2b	98,28 (97,49; 98,63)	CD64 ⁺ CD16 ^{bright} CD32 ^{mid} CD11b ^{mid}			
		138,50 (107,8; 144,75)	10,55* (8,51; 11,63)	16,33 (9,58; 25,20)	
%CD64 ⁺ CD16 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺					
	НГ, %	CD64 ^{mid} CD16 ^{mid} CD32 ^{dim} CD11b ^{mid}			
		MFI CD64	MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b
Группа сравнения	1,30 (0,18; 0,35)	7,92 (5,25; 11,20)	79,43 (65,13; 79,62)	5,50 (5,2; 6,31)	15,39 (14,87; 15,90)
Группа сравнения +рИФНа2b	0,15 (0,10; 0,41)	CD64 ^{bright} CD16 ^{dim} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}			
		12,10* (12,0; 12,58)	8,68* (6,13; 10,50)	6,97 (6,2; 7,56)	22,75* (18,65; 24,25)

Таблица 4. Влияние рИФН $\alpha 2b$ в эксперименте *in vitro* на фенотип субпопуляций CD64⁺CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ и CD64^{mid}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{mid}-НГ детей с МГИ, Ме (Q₁; Q₃)

CD64 ⁺ CD16 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺					
	НГ, %	CD64 ⁺ CD16 ^{bright} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}			
		MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b	
Группа сравнения	97,98 (96,88; 98,74)	129,50 (115,7; 131,75)	5,73 (4,76; 6,11)	19,40 (16,66; 20,93)	
МГИ	86,45* (80,49; 96,38)	CD64 ⁺ CD16 ^{mid} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}			
		81,5 (64,90; 97,3)*	5,31 (3,95; 5,95)	16,40 (12,88; 28,9)	
МГИ+ рИФН $\alpha 2b$	95,48 (85,82; 96,06)	CD64 ⁺ CD16 ^{mid} CD32 ^{dim} CD11b ^{dim}			
		87,7 (72,15; 95,55)	4,18 (3,93; 4,66)	9,51* (9,17; 15,00)	
CD64 ⁺ CD16 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺					
	НГ, %	CD64 ^{bright} CD16 ^{mid} CD32 ^{dim} CD11b ^{mid}			
		MFI CD64	MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b
Группа сравнения	1,30 (0,38; 1,35)	7,92 (5,25; 12,20)	79,43 (65,13; 79,62)	5,50 (5,2; 6,31)	15,39 (14,87; 15,90)
МГИ	14,45* (5,58; 15,71)	CD64 ^{dim} CD16 ^{mid} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}			
		3,36* (2,19; 4,72)	71,2 (60,20; 98,18)	6,06 (5,02; 7,56)	24,6* (17,68; 37,12)
МГИ+ рИФН $\alpha 2b$	3,80* [^] (3,63; 5,45)	CD64 ^{mid} CD16 ^{dim} CD32 ^{dim} CD11b ^{mid}			
		5,32 (2,78; 16,65)	52,1* (41,55; 64,00)	5,43 (4,84; 6,71)	13,6 (12,28; 18,75)

на фоне достоверного снижения плотности экспрессии молекулы CD16 ($p < 0,05$) и MFI CD11b ($p > 0,05$) (см. табл. 4).

Исследование влияния рИФН $\alpha 2b$ на фагоцитарную и микробицидную NADPH-зависимую функцию позволило выявить эффекты, связанные с модулированием рецепторного аппарата.

Так, под воздействием рИФН $\alpha 2b$ на НГ группы сравнения при неизменяющемся количестве активно фагоцитирующих НГ происходит усиление процессов захвата бактериального антигена (ФЧ и ФИ) и его переваривания (ИП). Также выявлено усиление микробицидной активности с сохранением потенциала ответа на дополнительную антигенную нагрузку в системе *in vitro* (рис. 3).

При исследовании фагоцитарной функции НГ у детей с МГИ отмечался количественный дефицит активно фагоцитирующих НГ [%ФАГ 49,00 (39,26; 53,00) против 55,25 (54,0; 57,0) в группе сравнения, $p < 0,05$]. При этом были увеличены показатели поглотительной способности НГ: ФЧ – 5,17 (3,92; 5,57) против 4,1 (3,72; 5,7) в группе сравнения ($p > 0,05$) и ФИ 2,69 (1,8; 3,55) против 2,46 (1,77; 3,25) в группе сравнения ($p > 0,05$). Также выявлено снижение процессов переваривания: % П – 53,13 (42,5; 57,72) против 61,62 (57,9; 62,92)% в группе сравнения, ИП – 1,27 (0,65; 1,35) против 1,57 (1,37; 1,88) в группе сравнения ($p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$). В то же время в группе с МГИ отмечалось значительное увеличение спонтанной и индуцированной активности NADPH-оксидаз ($p < 0,05$) без сохранения резервного микробицидного потенциала, о чем свидетельствует низкий КМ ($p < 0,05$) (рис. 4).

Эффекты рИФН $\alpha 2b$, направленные на восстановление %ФАГ, функций переваривания и поддержания напряженности NADPH-оксидаз, необходимых для реализации ответа на инфекционный процесс, различались по интенсивности воздействий (см. рис. 4). Так, под влиянием рИФН $\alpha 2b$ фагоцитарная активность НГ имела тенденцию к восстановлению, но показатели всех исследуемых параметров оставались ниже соответствующих значений в группе сравнения: %ФАН ($p < 0,05$), ФЧ ($p < 0,05$), ФИ ($p < 0,05$), ИП ($p < 0,05$). При этом резервная NADPH-оксидазная активность повысилась в 2 раза по КМ по сравнению с исходными данными, что было выше соответствующих значений в группе сравнения ($p_1 < 0,05$ и $p_2 < 0,05$, соответственно) (рис. 4).

Обсуждение

Таким образом, в результате исследования установлены варианты негативной трансформации фенотипов функционально-значимых субпопуляций НГ: увеличение количества активированных CD62L^{dim}CD63^{mid}-НГ и CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ на фоне снижения уровня мажорной субпопуляции CD64⁺CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}, не позволяющие НГ эффективно осуществлять фагоцитарную и микробицидную функции. Выявлена субпопуляция CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}-НГ, обладающая неадекватными провоспалительными свойствами, повышение численности которой может расцениваться как прогностически неблагоприятный признак течения МГИ.

При экспериментальном исследовании в системе *in vitro* установлены иммуномодулирующие эффекты

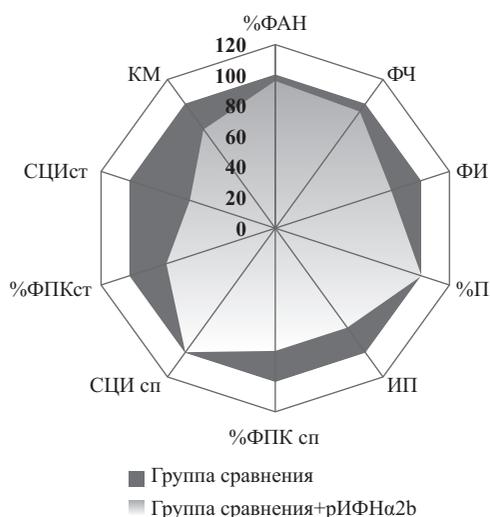


Рис. 3. Эффекты рИФН α 2b на фагоцитарную и микробицидную NADPH-зависимую функцию нейтрофильных гранулоцитов группы условно здоровых детей

рИФН α 2b на негативно трансформированный фенотип НГ при локальном гнойном процессе проявляющийся в переориентации НГ с провоспалительного фенотипа в противовоспалительный. Так, установлено, что под влиянием рИФН α 2b происходит снижение количества НГ субпопуляции CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺-НГ с параллельным увеличением количества НГ субпопуляции CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺-НГ. Иными словами, рИФН α 2b способствует перепрограммированию негативно трансформированного при гнойно-воспалительном процессе фенотипа минорной субпопуляции в фенотип мажорной субпопуляции, что обеспечивает перестройку НГ с воспалительного фенотипа на противовоспалительный. При этом параллельно происходит усиление функциональной активности НГ и развивается адекватный ответ этих клеток на инфекционно-воспалительный процесс.

■ Литература

1. Cortjens B., Ingelse S.A., Calis J.C., Vlaar A.P., Koenderman L., Bem R.A. et al. Neutrophil subset responses in infants with severe viral respiratory infection. *Clinical immunology*. 2017; 176: 100–6. DOI: 10.1016/j.clim.2016.12.012.
2. Балмасова И.П., Сепиашвили Р.И., Малова Е.С., Ефратова Е.П., Юшук Н.Д. Коинфекция вирусами иммунодефицита человека и гепатита С как модель иммунного ответа на патогены иммунотропного действия. *Аллергология и иммунология*. 2019; 20 (1): 5–9.
3. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евлевский А.А. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты. *Иммунология*. 2012; 33 (5): 281–8.
4. Hong C.W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw*. 2017; 17 (5): 298–306. URL: <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.5.298>. (дата обращения: 22.09.2017)
5. Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К. Нейтрофил как «многонациональное» устройство иммунной системы. *Инфекции и иммунитет*. 2019; 9 (1): 9–38.

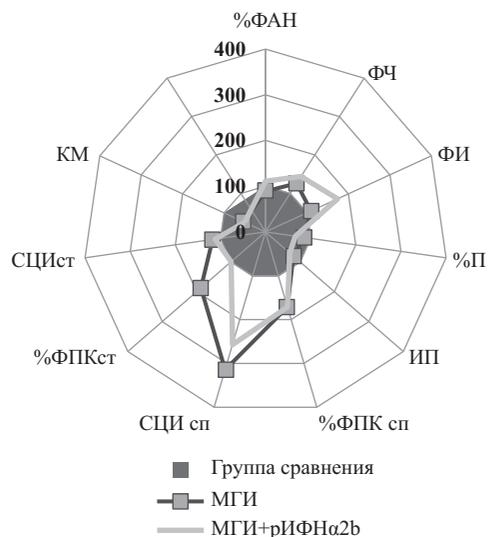


Рис. 4. Эффекты рИФН α 2b на фагоцитарную и микробицидную NADPH-зависимую функцию нейтрофильных гранулоцитов группы детей с МГИ

Таким образом, получены абсолютно новые данные о различных субпопуляциях НГ и негативной трансформации фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ при МГИ у детей. Уточнены возможности перепрограммирования фенотипа различных субпопуляций НГ с помощью рИФН α 2b, которое способствует позитивной регуляции функциональной активности клеток. Новые знания об особенностях неадекватного реагирования субпопуляций НГ при МГИ у детей, а также полученные данные о возможности коррекции негативно трансформированных функций НГ, являются, с нашей точки зрения, многообещающими и могут использоваться, с одной стороны, для иммунодиагностики дефектов функционирования НГ при иммунозависимых инфекционно-воспалительных заболеваниях, а с другой стороны – способствовать разработке новых иммунотерапевтических подходов, улучшающих эффективность проводимого комплексного лечения.

6. Долгушин И.И. Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 30–7.
7. Beyrau M., Bodkin J.V., Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol*. 2012; 2: 120–34. DOI: 10.1098/rsob.120134.
8. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol*. 2013; 35: 455–63. DOI: 10.1007/s00281-013-0375-7.
9. Scapini P., Cassatella M.A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014; 124: 710–9. DOI: 10.1182/blood-2014-03-453217.
10. Sagiv J.Y., Michaeli J., Assi S., Mishalian I., Kisos H., Levy L. et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*. 2015; 10 (4): 562–73. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.12.039.
11. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*. 2016; 127: 2173–81. DOI: 10.1182/blood-2016-01-68888.

12. Scapini P., Marini O., Tecchio C. Cassatella M.A. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunological reviews*. 2016; 273: 48–60. URL: <https://doi.org/10.1111/immr.12448>.

13. Zhong M., Yang H., Xu Y., Mao S. Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Sci. Rep.* 2018; 3, 8 (1): 9994. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28352-7>. (дата обращения: 20.06.2018)

14. Moses K., Brandau S. Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. *Semin. Immunol.* 2016; 28 (2): 187–96. DOI: 10.1016/j.smim.2016.03.018

15. Tamassia N., Cassatella M.A., Bazzoni F. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1124: 451–67. DOI: 10.1007/978-1-62703-845-4-279

16. Tamassia N., Bianchetto-Aguilera F., Arruda-Silva F., Gardiman E., Gasperini S., Calzetti F. et al. Cytokine production by human neutrophils: «Revisiting the dark side of the moon». *European journal of clinical investigation*. 2018; 48: e12952. URL: <https://doi.org/10.1111/eci.12952>. (дата обращения: 17.05.2018)

17. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Фомина Л.О., Файзуллина А.И., Гриценко В.А. Нейтрофилы как цитокинопродуцирующие клетки. *Российский иммунологический журнал*. 2019; 22 (4): 1469–71.

18. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature reviews. Immunology*. 2018; 18 (2): 134–47. DOI:10.1038/nri.2017.105.

19. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. Санкт-Петербург: Фолиант, 2018: 512 с.

20. Lin A., Lore K. Granulocytes: new members of the antigen-presenting cell family. *Frontiers in Immunology*. 2017; 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01781>. (дата обращения: 28.10.2017)

21. Mishalian I., Granot Z., Fridlender Z.G. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2017; 222: 82–8. URL: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.02.001>. (дата обращения 01.02.2016)

22. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтадидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм (Часть 1). *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7 (3): 219–30. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.

23. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтадидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление

старых догм (Часть 2). *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8 (1): 7–18. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.

24. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтадидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле. *Иммунология*. 2015; 36 (4): 257–65.

25. Pincetic A., Bournazos S., DiLillo D.J., Maamary J., Wang T.T., Dahan R. et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nature immunology*. 2014; 15: 707–16. DOI: 10.1038/ni.2939.

26. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. The role and function of Fc γ receptors on myeloid cells. *Microbiology spectrum*. 2016; 4 (6): 10. DOI: 10.1128/microbiolspec.

27. Jakus Z., Németh T., Verbeek J.S., Mócsai A. Critical but overlapping role of Fc γ RIII and Fc γ RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol*. 2008; 180: 618–29. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.618>. (дата обращения 22.09.2007).

28. Coxon A., Cullere X., Knight S., Sethi S., Wakelin M.W., Stavrakis G. Fc γ RIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. A mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity*. 2001; 14: 693–704. URL: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00150-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00150-9). (дата обращения 22.06.2001)

29. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. The Role and Function of Fc γ Receptors on Myeloid Cells. *Microbiology spectrum*. 2016; 4 (6): 10. DOI: <https://doi.org/10.1128/9781555819194.ch22>.

30. Bartlett J.G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Topics in HIV medicine: a publication of the International AIDS Society, USA*. 2008; 16 (5): 151–5.

31. Fournier B., Philpott D.J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clinical microbiology reviews*. 2005; 18: 521–40. doi: 10.1128/CMR.18.3.521-540.2005.

32. Owens C.D., Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *The Journal of hospital infection*. 2008; 70 (2): 3–10. URL: [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(08\)60017-1](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(08)60017-1). (дата обращения: 18.10.2008)

33. Whitman T.J. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Disease-a-month: DM*. 2008; 54 (12): 780–6.

34. Шмагель К.В., Зубарева Н.А., Ренжин А.В. Местный иммунитет гнойных ран. *Медицинская иммунология*. 2010; 12 (4–5): 393–8.

35. Потапнев М.П., Гущина Л.М., Мороз Л.А. Фенотипическая и функциональная гетерогенность субпопуляций нейтрофилов в норме и при патологии. *Иммунология*. 2019; 40 (5): 84–96.

■ References

1. Cortjens B., Ingelse S.A., Calis J.C., Vlaar A.P., Koenderman L., Bem R.A., et al. Neutrophil subset responses in infants with severe viral respiratory infection. *Clinical immunology*. 2017; 176: 100–6. DOI: 10.1016/j.clim.2016.12.012.

2. Balmasova I.P., Sepiashvili R.I., Malova E.S., Efratova E.P., Yushchuk N.D. Co-infection with human immunodeficiency viruses and hepatitis C as a model of the immune response to immunogenic pathogens. *Allergologiya i immunologiya*. 2019; 20 (1): 5–9. (in Russian)

3. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Evglevskiy A.A. The dual role of neutrophilic granulocytes in the implementation of antitumor protection. *Immunologiya*. 2012; 33 (5): 281–8. (in Russian)

4. Hong C.W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw*. 2017; 17 (5): 298–306. URL: <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.5.298>.

5. Dolgushin I.I., Mezentseva E. A., Savochkina A. Yu., Kuznetsova E. K. Neutrophil as a «multinational» device of the immune system. *Infektsii i immunitet*. 2019; 9 (1): 9–38. (in Russian)

6. Dolgushin I.I. Neutrophilic granulocytes: new faces of old acquaintances. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2019; 18 (1): 30–7. (in Russian)

7. Beyrau M., Bodkin J.V., Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol*. 2012; 2: 120–34. DOI: 10.1098/rsob.120134.

8. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol*. 2013; 35: 455–63. DOI: 10.1007/s00281-013-0375-7.

9. Scapini P., Cassatella M.A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014; 124: 710–9. DOI: 10.1182/blood-2014-03-453217.

10. Sagiv J.Y., Michaeli J., Assi S., Mishalian I., Kisos H., Levy L., et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*. 2015; 10 (4): 562–73. DOI:10.1016/j.celrep.2014.12.039.

11. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*. 2016; 127: 2173–81. DOI:10.1182/blood-2016-01-68888.

12. Scapini P., Marini O., Tecchio C. Cassatella M.A. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunological reviews*. 2016; 273: 48–60. URL: <https://doi.org/10.1111/immr.12448>.

13. Zhong M., Yang H., Xu Y., Mao S. Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Sci. Rep.* 2018; 3, 8 (1): 9994. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28352-7>.

14. Moses K., Brandau S. Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. *Semin. Immunol.* 2016; 28 (2): 187–96. DOI: 10.1016/j.smim.2016.03.018.

15. Tamassia N., Cassatella M.A., Bazzoni F. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1124: 451–67. DOI: 10.1007/978-1-62703-845-4-279.

16. Tamassia N., Bianchetto-Aguilera F., Arruda-Silva F., Gardiman E., Gasperini S., Calzetti F. et al. Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the «dark side of the moon». *European*

- journal of clinical investigation. 2018; 48: e12952. URL: <https://doi.org/10.1111/eci.12952>.
17. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Fomina L.O., Fayzullina A.I., Gritsenko V.A. Neutrophils as cytokine-producing cells. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2019; 22 (4): 1469–71. (in Russian)
 18. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature reviews. Immunology*. 2018; 18 (2): 134–47. DOI: 10.1038/nri.2017.105.
 19. Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases. St. Petersburg: Foliant, 2018: 512 p.
 20. Lin A., Lore K. Granulocytes: new members of the antigen-presenting cell family. *Frontiers in Immunology*. 2017; 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01781>.
 21. Mishalian I., Granot Z., Fridlender Z.G. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2017; 222: 82–8. URL: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.02.001>.
 22. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevskiy A.A., et. al. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7 (3): 219–30. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230 12. (in Russian)
 23. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevskiy A.A., et. al. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet*. 2018; 8 (1): 7–18. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18 12. (in Russian)
 24. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevskiy A.A. Neutrophilic granulocytes: a new look at the «old players» in the immunological field. *Immunologiya*. 2015; 36 (4): 257–65. (in Russian)
 25. Pincetic A., Bournazos S., DiLillo D.J., Maamary J., Wang T.T., Dahan R., et. al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nature immunology*. 2014; 15: 707–16. DOI: 10.1038/ni.2939.
 26. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. The role and function of Fcγ receptors on myeloid cells. *Microbiology spectrum*. 2016; 4 (6): 10. DOI: 10.1128/microbiolspec.
 27. Jakus Z., Németh T., Verbeek J.S., Mócsai A. Critical but overlapping role of FcγRIII and FcγRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol*. 2008; 180: 618–29. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.618>.
 28. Coxon A., Cullere X., Knight S., Sethi S., Wakelin M.W., Stavrakis G. FcγRIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. A mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity*. 2001; 14: 693–704. URL: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00150-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00150-9).
 29. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. The Role and Function of Fcγ Receptors on Myeloid Cells. *Microbiology spectrum*. 2016; 4 (6). URL: <https://doi.org/10.1128/9781555819194.ch22>.
 30. Bartlett J.G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Topics in HIV medicine: a publication of the International AIDS Society, USA*. 2008; 16 (5): 151–5.
 31. Fournier B., Philpott D.J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clinical microbiology reviews*. 2005; 18: 521–540. DOI: 10.1128/CMR.18.3.521-540.2005.
 32. Owens C.D., Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *The Journal of hospital infection*. 2008; 70 (2): 3–10. URL: [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(08\)60017-1](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(08)60017-1).
 33. Whitman T.J. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Disease-a-month: DM*. 2008; 54 (12): 780–6.
 34. Shmagel' K.V., Zubareva N.A., Renzhin A.V. Local immunity of purulent wounds. *Meditinskaya immunologiya*. 2010; 12 (4–5): 393–8. (in Russian)
 35. Potapnev M.P., Hushchyna L.M., Moroz L.A. Human neutrophils subpopulations and functions heterogeneity in norm and pathology. *Immunologiya*. 2019; 40 (5): 84–96.

© Коллектив авторов, 2020

Ковыршина А.В.¹, Должикова И.В.¹, Гроусова Д.М.¹, Балясин М.В.¹,
Ботиков А.Г.¹, Панина Л.В.¹, Гордейчук И.В.¹⁻³, Гуляев С.А.³, Зубкова О.В.¹,
Ожаровская Т.А.¹, Попова О.¹, Тухватулин А.И.¹, Токарская Е.А.¹,
Симакова Я.В.¹, Есмагамбетов И.Б.¹, Щебляков Д.В.¹, Евграфова И.М.¹,
Дерябин П.Г.¹, Борисевич С.В.⁴, Народицкий Б.С.^{1,2}, Логунов Д.Ю.¹,
Гинцбург А.Л.^{1,2}

Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 108819, г. Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «48-й центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, г. Сергиев Посад-6, Российская Федерация

Резюме

Введение. Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) – это острое воспалительное заболевание дыхательной системы с высокой летальностью, возбудителем которого является коронавирус БВРС-КоВ. В настоящее время в мире не существует специфических профилактических и терапевтических средств против БВРС. Вакцинопрофилактика позволит ограничить распространение данного заболевания и снизить летальность. Одной из ключевых характеристик вакцин является длительность индуцируемого иммунного ответа, от которой зависит продолжительность протективного эффекта вакцины. К сожалению, данных по длительности поствакцинального иммунного ответа для вакцин против БВРС сейчас недостаточно.

Цель исследования – определение длительности гуморального иммунного ответа у грызунов и приматов и протективного иммунного ответа после иммунизации комбинированной векторной вакциной против БВРС (БВРС-ГамВак-Комби), разработанной нами ранее.

Материал и методы. Длительность гуморального иммунитета исследовали на мышах линии C57BL/6 и обычных иррегулярных. Животных иммунизировали вакциной БВРС-ГамВак-Комби на основе рекомбинантных векторов rAd26 и rAd5. Титр антиген-специфических антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Титр вирус-нейтрализующих антител определяли с помощью реакции вирус-нейтрализации против вируса БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012). Длительность протективного иммунитета исследовали на модели летальной инфекции у трансгенных мышей, несущих ген человека *DPP4*, кодирующий рецептор к БВРС-КоВ.

Результаты. Исследование длительности поствакцинального гуморального иммунного ответа у грызунов и приматов показало, что вакцинация животных БВРС-ГамВак-Комби индуцирует формирование напряженного гуморального иммунного ответа к гликопротеину S БВРС-КоВ, который сохраняется на протяжении не менее 18 мес. Также было показано, что вакцинация позволяет защитить 100 % животных от летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012, 100 ЛД₅₀/мышь), через 7 мес после иммунизации.

Заключение. Напряженность поствакцинального гуморального иммунного ответа, как правило, связана с протективностью вакцины. Одной из ключевых задач при дизайне

Для корреспонденции
Логунов Денис Юрьевич –
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН,
заместитель директора
по научной работе,
заведующий лабораторией
клеточной микробиологии
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России,
Москва, Российская Федерация
E-mail: logunov@gamaleya.org
<https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

вакцин является обеспечение наиболее длительного напряженного иммунного ответа. Длительность поствакцинального иммунного ответа – одна из ключевых характеристик вакцин, которая требует контроля на различных этапах их разработки.

Ключевые слова: вакцина; аденовирусный вектор; ближневосточный респираторный синдром; длительность иммунитета

Статья поступила 16.01.2020. Принята в печать 20.02.2020.

Для цитирования: Ковыршина А.В., Должикова И.В., Гроусова Д.М., Балясин М.В., Ботиков А.Г., Панина Л.В., Гордейчук И.В., Гуляев С.А., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Тухватулин А.И., Токарская Е.А., Симакова Я.В., Есмагамбетов И.Б., Шебляков Д.В., Евграфова И.М., Дерябин П.Г., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ. Иммунология. 2020; 41 (2): 135–143. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143

Финансирование: Исследование выполнено в рамках Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 056-00108-18-00 и 056-00078-19-00.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Kovyrshina A.V.¹, Dolzhikova I.V.¹, Grousova D.M.¹, Balyasin M.V.¹,
Botikov A.G.¹, Panina L.V.¹, Gordeychuk I.V.¹⁻³, Gulyaev S.A.³, Zubkova O.V.¹,
Ozharovskaya T.A.¹, Popova O.¹, Tkhvatulin A.I.¹, Tokarskaya E.A.¹,
Simakova Ya.V.¹, Esmagambetov I.B.¹, Sheblyakov D.V.¹, Evgrafova I.M.¹,
Deryabin P.G.¹, Borisevich S.V.⁴, Naroditsky B.S.^{1,2}, Logunov D.Yu.¹,
Gintsburg A.L.^{1,2}**

A heterologous virus-vectored vaccine for prevention of Middle East respiratory syndrome induces long protective immune response against MERS-CoV

¹ Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russian Federation

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

³ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Ministry of High Education and Science of the Russian Federation, 108819, st. Moskovskiy, Poliomyelitis Institute ts., Moscow, Russian Federation

⁴ 48 Central Research Institute, Ministry of Defense of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad-6, Russian Federation

Abstract

Introduction. Middle East respiratory syndrome (MERS) is acute inflammatory disease of respiratory system with a high mortality, caused by coronavirus MERS-CoV. At present moment, we still lack specific therapeutic preparations and vaccines against MERS. Vaccine administration can help to limit the spread of the disease and lower the mortality. Duration of vaccine-induced immune response is one of the key characteristics of a vaccine, which is connected with duration of its protective effectiveness. Unfortunately, the data on duration of vaccine-induced immune response against MERS is scarce.

The aim of the study was to determine duration of humoral immune response in mice and primates and duration of protective immune response in mice after immunization with the heterologous virus-vectored vaccine against MERS (BVRV-GamVac-Combi), developed earlier by our research group.

Material and methods. To study duration of humoral immune response, we used mice of C57BL/6 strain and common marmosets. Animals were immunized with the vaccine BVRV-GamVac-Combi, based on recombinant adenoviral vectors rAd26 and rAd5. Antigen-specific-antibody titers were determined with ELISA, virus-neutralizing antibody titers were measured with virus neutralization assay using MERS-CoV (EMC/2012). To study duration of protective immune response, we used a model of lethal infection on transgenic mice, carrying human *DPP4* gene of viral receptor.

For correspondence

Denis Yu. Logunov –
Dr.Sci. (Biological Sciences),
Corresponding Member of RAS,
Deputy Director for Research,
Head of the Laboratory
of Cell Microbiology,
Federal Research Center
for Epidemiology and Microbiology
named after Honorary Academician
N.F. Gamaleya, Moscow,
Russian Federation
E-mail: logunov@gamaleya.org
<https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Results. In present research, we showed that vaccination of animals with BVRS-GamVac-Combi induced robust humoral immune response, which persisted at least 18 months after immunization. In addition, our vaccine protected 100 % of animals from lethal infection for at least 7 months after immunization.

Conclusion. Strength of vaccine-induced immune response is generally connected with a protective effectiveness of a vaccine. One of the key problems of vaccine design is to find a way to provide as long and robust immune response as possible. Duration of vaccine-induced immune response is one of the key characteristics of a vaccine, which demands quality control during multiple steps of a vaccine development.

Keywords: vaccine; adenoviral vectors; Middle East respiratory syndrome (MERS); longevity of immune response

Received 16.01.2020. **Accepted** 20.02.2020.

For citation: Kovyrschina A.V., Dolzhikova I.V., Grousova D.M. Balyasin M.V., Botikov A.G., Panina L.V., Gordeychuk I.V., Gulyaev S.A., Zubkova O.V., Ozharovskaya T.A., Popova O., Tukhvatulina A.I., Tokarskaya E.A., Simakova Ya.V., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Evgrafova I.M., Deryabin P.G., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. A heterologous virus-vectored vaccine for prevention of Middle East respiratory syndrome induces long protective immune response against MERS-CoV. *Immunology*. 2020; 41 (2): 135–43. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143 (in Russian)

Funding. The study was carried out as part of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation No 056-00108-18-00 and 056-00078-19-00.

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

Введение

Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) – это острое воспалительное заболевание дыхательной системы, возбудителем которого является коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ), относящийся к семейству коронавирусов (*Coronaviridae*), род бетакоронавирусов (*Betacoronavirus*). Данное заболевание было впервые диагностировано в июне 2012 г. в Саудовской Аравии [1, 2]. Согласно данным ВОЗ, на конец января 2020 г. зарегистрировано 2519 лабораторно подтвержденных случаев БВРС, в том числе 866 со смертельным исходом, летальность составляет около 34,3 % [3]. Большинство случаев БВРС зарегистрировано в Саудовской Аравии, однако заболевание также выявляли еще в 27 странах, завозные случаи инфекции были зарегистрированы в Европе, Северной Африке, Северной Америке и Азии [4]. Естественным резервуаром вируса являются одногорбые верблюды, заражение человека происходит при контакте с верблюдами, употреблении непастеризованного верблюжьего молока, возможен аэрозольный путь передачи инфекции среди верблюдов, от верблюдов к человеку, а также от человека к человеку [5, 6]. Несмотря на то что в предыдущих вспышках инфекции передача от человека к человеку имела ограниченный характер, сохраняется риск адаптации вируса и повышения контагиозности при передаче между людьми, что представляет потенциальную угрозу для глобального благополучия [7]. Эксперты ВОЗ относят БВРС-КоВ к агентам с пандемическим потенциалом в связи с широким распространением резервуара инфекции, высоким уровнем летальности, отсутствием популяционного иммунитета и эффективных профи-

лактических и терапевтических средств против БВРС. В России на настоящий момент не зафиксированы случаи БВРС, однако в связи с сохраняющейся угрозой распространения БВРС за пределы эндемичных районов и высокой летальностью инфекции [8] разработка вакцинного препарата является актуальной задачей.

Формирование выраженного и длительного иммунного ответа – одна из ключевых задач при разработке вакцин. Перспективной платформой для производства вакцинных препаратов являются рекомбинантные вирусные векторы для доставки антигена. Такие векторы обеспечивают длительную экспрессию антигена в клетках иммунизируемого организма, что приводит к развитию выраженного иммунного ответа. Для формирования длительного иммунного ответа целесообразно проводить двукратную вакцинацию, при этом наиболее оптимальной схемой является гетерологичная вакцинация, когда для первичной и вторичной иммунизации используют различные вирусные векторы [9]. Такой подход был успешно реализован нами при разработке комбинированной векторной вакцины для профилактики болезни, вызванной вирусом Эбола, зарегистрированной в России для медицинского применения в 2015 г. [10].

Нами разработана комбинированная векторная вакцина для профилактики БВРС на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, экспрессирующих гликопротеин вируса БВРС-КоВ (изолят MERS-CoV EMC/2012) – БВРС-ГамВак-Комби. На настоящий момент завершены доклинические исследования безопасности и иммуногенности вакцины, по результатам которых не выявлено противопоказаний к проведению клинических исследований. Начаты клини-

ческие исследования безопасности и иммуногенности комбинированной векторной вакцины [11]. В настоящем исследовании представлены результаты исследования длительности поствакцинального иммунного ответа у грызунов и приматов.

Материал и методы

Исследуемый препарат. Состав комбинированной векторной вакцины для профилактики БВРС в форме лиофилизатов для приготовления раствора для внутримышечной инъекции:

- Компонент 1 – рекомбинантные частицы на основе аденовируса человека 26 серотипа (rAd26), несущие ген рецептор-связывающего домена гликопротеина БВРС-КоВ, 10^{11} вирусных частиц (в.ч.) на дозу.
- Компонент 2 – рекомбинантные частицы на основе аденовируса человека 5 серотипа (rAd5), несущие ген полноразмерного гликопротеина БВРС-КоВ и ген рецептор-связывающего домена (RBD) гликопротеина БВРС-КоВ, 10^{11} в.ч. на дозу.

Препарат произведен в условиях биотехнологического производства филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Лабораторные животные. Самки мышей (*Mus musculus*) линии C57BL/6 (18–20 г) в возрасте 6 нед получены из питомника Пущино (Россия). Мыши имели свободный доступ к пище и воде. Животные были размещены в системе содержания животных ISOcage (Tecniplast, Италия).

Трансгенные мыши-гибриды F1 получены в результате скрещивания трансгенных гомозиготных самцов +/+, несущих ген рецептора дипептидилпептидазы (DPP4) человека (hDPP4) (Медицинский университет Техаса, США) и нетрансгенных самок линии C57BL/6 (Пущино, Россия). Мыши имели свободный доступ к пище и воде. Животные были размещены в системе содержания животных ISOcage (Tecniplast, Италия). Экспрессия трансгена у мышей-гибридов F1 была подтверждена методом иммуноблоттинга.

Обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*) рождены в специализированном виварии ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Москва, Россия). Животные содержались в Лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» в соответствии с требованиями к условиям содержания лабораторных приматов. Все экспериментальные манипуляции с игрунками проводились сертифицированным специалистом, имеющим сертификат Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA) и прошедшим курс обучения работе с приматами (Каролинский институт, Стокгольм, Швеция) – программа Laboratory Animal Science for Researchers – Non-Human Primates (Наука о лабораторных животных для исследо-

вателей – Нечеловекообразные приматы). Животных в эксперименте идентифицировали введением под кожу RFID-чипа с уникальным 15-значным кодом (Globalvet, Москва).

Эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации (ГОСТ Р 53434-2009, «Принципы надлежащей лабораторной практики»).

Иммунизация и отбор образцов сывороток крови мышей и обыкновенных игрунок. Мышей иммунизировали двукратным внутримышечным введением 3×10^7 в.ч./животное, последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Образцы крови мышей отбирали до иммунизации, через 12 и 18 мес после иммунизации.

Иммунизацию игрунок проводили двукратным внутримышечным введением дозы 10^{11} в.ч./животное, последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Образцы крови собирали до иммунизации, через 12 мес после иммунизации. Сыворотки крови получали путем выдерживания образцов крови при 37 °С в течение 30 мин, затем центрифугирования в течение 15 мин при 450g, после чего отбирали сыворотку. При наличии эритроцитов в сыворотке образцы центрифугировали повторно.

Определение титра антител методом иммуноферментного анализа (ИФА). Титр гликопротеин-специфических антител в сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антигена применяли белки гликопротеин S БВРС-КоВ (40069-V08B; Sino Biological) и RBD (рецептор-связывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ) (40071-V08B1; Sino Biological). Забивку проводили фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) с добавлением 0,1 % Твин 20 (ФСБ-Т) и 5 % обезжиренного молока (A0830; AppliChem, Испания). Сыворотку титровали двукратным шагом в растворе ФСБ-Т с добавлением 3 % обезжиренного молока. Для детекции гликопротеин-специфических IgG мыши применяли вторичные антитела анти-IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (NXA931; GE Healthcare, США). Для детекции гликопротеин-специфических IgG игрунок применяли сыворотку кролика, предварительно иммунизированного IgG мармозет, и вторичные антитела анти-IgG кролика конъюгированные с пероксидазой хрена (NA934V; GE Healthcare, США). Проявление проводили раствором тетраметилбензидина («НИИОПик», Россия). Реакцию останавливали добавлением 1M H₂SO₄, оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (OD₄₅₀) на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific). Титр IgG определяли как максимальное разведение сыворотки, при котором значение OD₄₅₀ сыворотки иммунизированного животного превосходит значение контрольной сыворотки (сыворотка контрольного неиммунизированного животного или животного до иммунизации) более чем в 2 раза.

Определение титра вирус-нейтрализующих антигел. Определение титра вирус-нейтрализующих антигел в сыворотке крови иммунизированных животных определяли в реакции нейтрализации по подавлению цитопатического действия, вызванного вирусом БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в монослое клеток Vero B. Реакцию нейтрализации ставили в варианте: постоянная доза вируса – разведения сыворотки. Сыворотку крови мышей инактивировали при температуре 56 °C в течение 30 мин для удаления неспецифических ингибиторов. Разведения всех сывороток готовили на среде DMEM с 2 % инактивированной фетальной бычьей сывороткой, начиная с 1 : 10, затем двукратным шагом до 1 : 5120. Разведения вирус-содержащей суспензии на основе вируса БВРС-КоВ готовили на среде DMEM с 2 % инактивированной фетальной бычьей сывороткой. В приготовленном разведении концентрация вируса БВРС-КоВ составила 1000 ТЦД₅₀/мл. Смесь сыворотки и суспензии вируса 1 : 1 инкубировали в течение 60 мин при 37 °C. Клетки Vero B засеивали в 96-луночные планшеты в количестве 4×10^4 клеток/лунку в объеме 100 мкл, затем к ним добавляли 100 мкл смеси сыворотки и суспензии вируса. Через 4 сут оценивали развитие цитопатического действия. За титр вирус-нейтрализующих антигел в исследуемой сыворотке принимали высшее ее разведение, при котором происходит подавление цитопатического действия в 2 лунках из 3 (по сравнению с контрольными сыворотками).

Исследование длительности протективного иммунитета на модели летальной инфекции БВРС-КоВ у мышей. Исследование длительности протективного иммунитета проводили на модели летальной инфекции у мышей. Использовали мышей-гибридов F1, несущих ген рецептора hDPP4 человека, полученных от скрещивания гомозиготных трансгенных самцов *hdpp4+/+* и нетрансгенных самок линии C57BL/6. Мышей иммунизировали внутримышечно, 3×10^7 в.ч./животное, двукратно последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Через 7 мес после иммунизации животных интраназально заражали БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в дозе 100 ЛД₅₀ на животное, затем ежедневно наблюдали выживаемость в течение 30 дней. После завершения эксперимента животных подвергали усыплению.

Статистический анализ

Результаты исследования статистически анализировали в программе GraphPad Prism версии 7.0 (GraphPad Software, США). Данные проверяли на нормальное распределение методом Д’Агостино–Пирсона. Достоверность различий между независимыми выборками оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок или *U*-критерия Манна–Уитни в зависимости от нормальности распределения данных. Для связанных выборок применяли парный *t*-критерий Стьюдента или парный критерий Вилкоксона, в зависи-

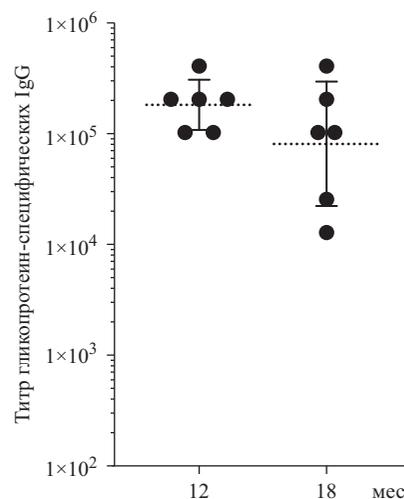


Рис. 1. Титры гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных мышей через 12 и 18 мес после вакцинации

По оси абсцисс – время после иммунизации, по оси ординат – реципрокные титры гликопротеин-специфических IgG относительно сывороток контрольных (неиммунизированных) мышей. Также на рисунке отмечены геометрическое среднее титра и 95 % доверительный интервал ($n = 6$).

мости от нормальности распределения данных [12]. Достоверность статистических различий принимали при значении $p < 0,05$ [13].

Результаты

Иммунизация комбинированной векторной вакциной индуцирует формирование длительного выраженного гуморального иммунного ответа к гликопротеину БВРС-КоВ у грызунов

Длительность гуморального иммунного ответа у грызунов после иммунизации разработанной вакциной исследовали на мышах (*Mus musculus*). Мышей внутримышечно иммунизировали вакциной в дозе 3×10^7 в.ч./животное последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Далее у животных отбирали сыворотку крови через 12 и 18 мес после иммунизации и определяли титры антигел, специфических к гликопротеину S БВРС-КоВ. Исследования длительности поствакцинального иммунного ответа у грызунов показали, что у иммунизированных мышей через 12 и 18 мес после иммунизации в сыворотке крови детектируются гликопротеин-специфические IgG в высоком титре: среднее геометрическое титров составило 1 : 182456 через 12 мес 1 : 81275 через 18 мес (рис. 1).

Также определяли титры вирус-нейтрализующих антигел к БВРС-КоВ в сыворотках крови мышей через 12 мес после иммунизации: среднее геометрическое титра вирус-нейтрализующих антигел составило 1 : 90 (рис. 2). В сыворотке крови контрольных мышей вирус-нейтрализующие антигел не детектированы.

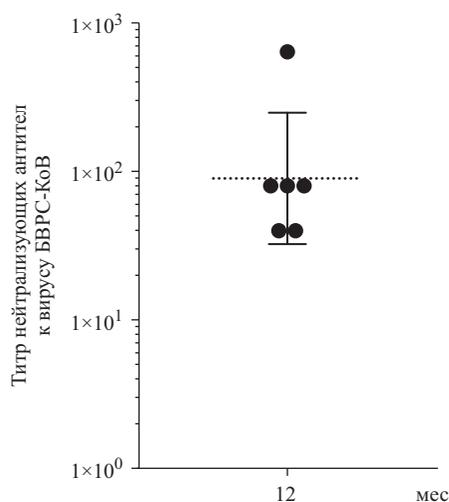


Рис. 2. Титры вирус-нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей через 12 мес после вакцинации

По оси ординат – реципрокные титры нейтрализующих антител к вирусу БВРС-КоВ. Также на рисунке отмечены геометрическое среднее титра и 95 % доверительный интервал ($n = 6$).

Иммунизация комбинированной векторной вакциной индуцирует формирование длительного выраженного гуморального иммунного ответа к гликопротеину БВРС-КоВ у приматов

Длительность гуморального иммунного ответа у приматов исследовали на обыкновенных игрунках (*Callithrix jacchus*). Животных иммунизировали комбинированной вакциной внутримышечно в дозе 10^{11} в.ч./животное, двукратно, последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Было показано, что через 12 мес после иммунизации у приматов сохраняются высокие титры гликопротеин-специфических IgG. У иммунизированных обезьян

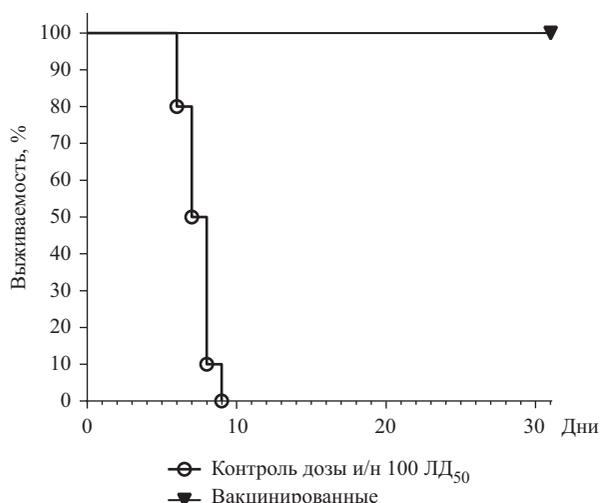


Рис. 3. Выживаемость мышей при заражении БВРС-КоВ через 7 мес после иммунизации комбинированной векторной вакциной против БВРС

через 12 мес после вакцинации титр гликопротеин-специфических антител составил $1 : 3276800$, титр нейтрализующих антител к вирусу БВРС-КоВ – $1 : 2560 - 1 : 5120$.

Иммунизация грызунов комбинированной векторной вакциной обеспечивает формирование длительного протективного иммунного ответа против летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ

Трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека, иммунизировали вакциной в дозе 3×10^7 в.ч./животное внутримышечно, двукратно, последовательно компонентом 1 и 2 с интервалом в 21 день. Через 7 мес после иммунизации животных заражали БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в дозе 100 ЛД_{50} на животное и анализировали выживаемость в течение 30 дней (рис. 3). Выживаемость в опытной группе животных, иммунизированных комбинированной векторной вакциной, составила 100 % (10/10). Выживаемость в контрольной группе неиммунизированных животных составила 0 % (0/10). Животные в контрольной группе погибли в течение 9 дней.

Обсуждение

Разработка вакцины против БВРС является актуальной задачей, учитывая постоянный контакт человека с верблюдами – естественными резервуарами БВРС-КоВ, возможность передачи вируса от человека к человеку, широкую географию распространения инфекции во время вспышек прошлых лет, высокую летальность и отсутствие специфических профилактических и терапевтических средств против БВРС. Исследования по разработке вакцин против этого заболевания ведутся в ряде стран (в США, Германии, Корее, Китае, Великобритании и др.). К настоящему времени завершены клинические исследования первой фазы вакцины на основе плазмидной ДНК GLS-5300, а также вакцины на основе вируса осповакцины MVA-MERS-S [14, 15]. Все вакцины, вышедшие в клинические исследования, основаны на использовании гликопротеина S вируса БВРС-КоВ, который взаимодействует с рецептором DPP4 на поверхности клетки и обеспечивает интернализацию вируса. Предотвращение такого взаимодействия позволяет ограничить проникновение вируса в клетки и его последующую репликацию.

Одной из ключевых характеристик вакцин является длительность поствакцинального иммунного ответа. Для подавляющего большинства вакцин развитие протективного иммунного ответа коррелирует с их способностью индуцировать синтез специфических вирус-нейтрализующих антител. Для разных патогенов пороговые значения концентраций (и, соответственно, титров) антител, обеспечивающих протективный иммунитет, различаются [16, 17]. Поэтому при исследовании иммуногенности вакцин длительность выраженного гуморального иммунного ответа является значимой характеристикой. Согласно профилю целевого продукта (TPP – target product profile) ВОЗ по разработке вакцин

против БВРС [18], для вакцин, применяемых у людей для формирования долгосрочного протективного иммунитета (например, для использования в эндемичных регионах в отсутствие вспышек эпидемии), предпочтительному профилю требований соответствует обеспечение протективного иммунитета на 5 лет, минимальному профилю требований – на 3 года после праймирующей вакцинации. Таким образом, важно контролировать соответствие вакцины необходимым требованиям по длительности иммунного ответа на различных этапах ее разработки.

Использование рекомбинантных вирусных векторов для доставки антигена при вакцинации позволяет индуцировать мощный гуморальный и клеточный иммунный ответ. Для формирования длительного иммунного ответа важно использовать двукратную иммунизацию [9], однако при использовании рекомбинантных вирусных векторов необходимо учитывать, что эффективность бустерной иммунизации может быть снижена, поскольку после первичной иммунизации ответ развивается не только на целевой антиген, но и на компоненты вектора. В связи с этим перспективным подходом является использование схемы гетерологичной прайм-буст-вакцинации, когда для первичной и для вторичной иммунизации используют различные рекомбинантные вирусные векторы [10], который был реализован при разработке комбинированной векторной вакцины против БВРС.

В настоящее время долгосрочный (через несколько месяцев после иммунизации) иммунный ответ, индуцируемый вакцинами против БВРС-КоВ еще недостаточно исследован. W. Jia и соавт. исследовали иммуногенность и протективность вакцины на основе рекомбинантного вектора аденовируса шимпанзе 68 серотипа, экспрессирующего гликопротеин S БВРС-КоВ (rAdC68). В модели летальной инфекции БВРС-КоВ выживаемость иммунизированных мышей через 10 нед после иммунизации составила 100 %, в контрольной группе – 0 % [19].

Исходя из представленных данных видно, что разработанная нами вакцина на основе рекомбинантных векторов rAd26 и rAd5 индуцирует мощный длительный гуморальный иммунный ответ (специфические IgG и вирус-нейтрализующие антитела). По результатам исследования длительности поствакцинального иммунного ответа было показано, что иммунизация животных разработанной вакциной позволяет сформировать длительный выраженный гуморальный иммунный ответ, который сохраняется на протяжении не менее 18 мес после иммунизации. При исследовании разработанной комбинированной векторной вакцины у мышей обнаружено, что специфические антитела в сыворотке крови животных детектируются спустя 18 мес после иммунизации в высоких титрах. Исследование протективной эффективности вакцины на модели летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ, у трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека, продемонстрировало, что иммунизация животных по-

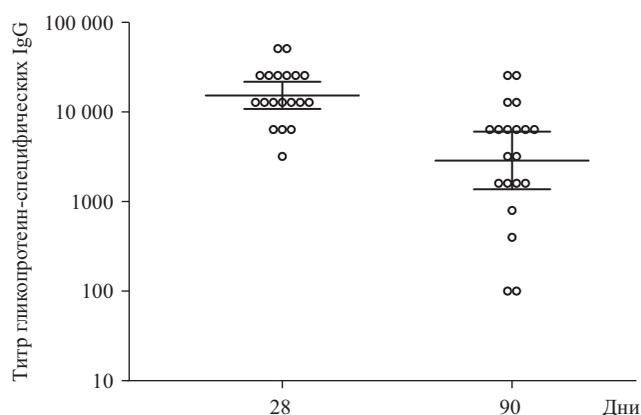


Рис. 4. Титры гликопротеин-специфических IgG-антител в сыворотках крови здоровых добровольцев, иммунизированных расчетной терапевтической дозой комбинированной векторной вакцины, через 28 и 90 дней после первичной вакцинации

По оси абсцисс – время после иммунизации; по оси ординат – реципрокные титры гликопротеин-специфических IgG относительно сывороток добровольцев, взятых до иммунизации. Также на рисунке отмечены геометрическое среднее титра и 95 % доверительный интервал ($n = 20$).

зволяет защитить их от летальной инфекции БВРС-КоВ (100 ЛД₅₀) через 7 мес после вакцинации. Исследование длительности гуморального иммунного ответа у приматов (обыкновенные игрунки) показало, что через 12 мес после вакцинации у обезьян в сыворотке крови детектируются гликопротеин-специфические антитела и вирус-нейтрализующие антитела к БВРС-КоВ в высоких титрах.

Также на настоящий момент завершена первая фаза клинических исследований безопасности и иммуногенности комбинированной векторной вакцины для профилактики БВРС – БВРС-ГамВак-Комби [11]. Согласно предварительным результатам, подтверждены хорошая переносимость и безопасность вакцины, а также ее высокая иммуногенность. Показано, что вакцина индуцирует развитие мощного гуморального иммунного ответа, который сохраняется на протяжении не менее 90 дней после иммунизации. Так, среднее геометрическое титров гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови здоровых добровольцев составило 1 : 15361 через 28 дней после первичной вакцинации и 1 : 2884 через 90 дней после первичной вакцинации (рис. 4).

Геометрическое среднее титров вирус-нейтрализующих антител в сыворотках крови здоровых добровольцев, иммунизированных расчетной терапевтической дозой вакцины, составило 1 : 143 через 28 дней после первичной вакцинации (рис. 5).

Заключение

Длительность поствакцинального иммунного ответа является одной из ключевых характеристик вакцин и требует контроля на различных этапах их разработки. В настоящий момент длительность поствакцинального

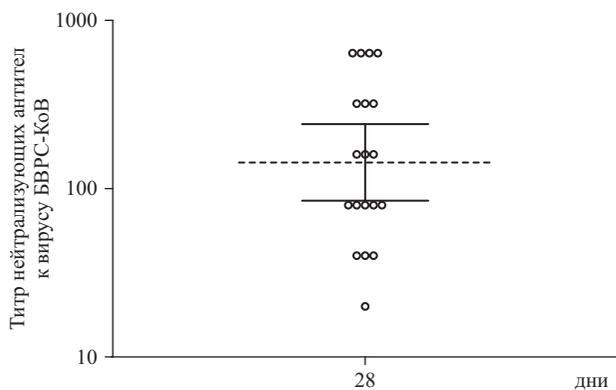


Рис. 5. Титры вирус-нейтрализующих антител в сыворотках крови здоровых добровольцев, иммунизированных расчетной терапевтической дозой вакцины, через 28 дней после первичной вакцинации. Также на рисунке отмечены геометрическое среднее титра и 95 % доверительный интервал ($n = 20$)

■ Литература

1. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drost C., Enjuanes L. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 2013; 87 (14): 7790–2. DOI: 10.1128/JVI.01244-13.
2. Zaki A.M., van Boheemen., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia [published correction appears in *N. Engl. J. Med.* 2013; 369 (4): 394]. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367 (19): 1814–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.
3. World Health Organisation. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2020. URL: <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html>. (дата обращения: 19.03.20)
4. World Health Organisation. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2020. URL: <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html>. (дата обращения: 19.03.20)
5. Memish Z.A., Cotten M., Meyer B., Watson S.J., Alshafiq A.J., Al Rabeeah A.A. et al. Human infection with MERS coronavirus after exposure to infected camels, Saudi Arabia, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20 (6): 1012–5. DOI: 10.3201/eid2006.140402.
6. Reusken C.B., Farag E.A., Jonges M., Godeke G.J., El-Sayed A.M., Pas S.D. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19 (23): 208–29. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.23.20829.
7. Cho H., Excler J.L., Kim J.H., Yoon I.K. Development of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus vaccines – advances and challenges. *Hum. Vaccines Immunother.* 2018; 14 (2): 304–13. DOI: 10.1080/21645515.2017.1389362.
8. World Health Organisation. WHO Research and Development Blueprint: 2017 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint. 2017. URL: <http://www.who.int/blueprint/what/research-development/2017-Prioritization-Long-Report.pdf>. (дата обращения: 19.03.20)
9. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21 (3): 346–51. DOI: 10.1016/j.coi.2009.05.016.

■ References

1. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drost C., Enjuanes L., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 2013; 87 (14): 7790–2. DOI: 10.1128/JVI.01244-13.
2. Zaki A.M., van Boheemen., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia [published correction appears in *N. Engl.*

иммунного ответа у вакцин для профилактики БВРС недостаточно изучена. В настоящей работе была исследована длительность поствакцинального гуморального иммунитета у грызунов и приматов после иммунизации комбинированной векторной вакциной для профилактики БВРС на основе рекомбинантных аденовирусных векторов гAd26 и гAd5. Было показано, что:

- разработанная вакцина индуцирует у мышей и приматов формирование напряженного длительного гуморального иммунного ответа к гликопротеину S БВРС-КоВ (в том числе и вирус-нейтрализующих антител), который сохраняется на протяжении не менее 18 мес;
- разработанная вакцина обеспечивает формирование протективного иммунного ответа у мышей, который сохраняется на протяжении не менее 7 мес после вакцинации.

10. Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulina A.I., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V. et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum. Vaccines Immunother.* 2017; 13 (3): 613–20. DOI: 10.1080/21645515.2016.1238535.
11. Study of Safety and Immunogenicity of BVRV-GamVac-Combi ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04128059. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04128059>. (дата обращения: 19.03.20)
12. Унгуриян Т.Н., Гржибовский А.М. Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях. *Экология человека.* 2011; (5): 55–60.
13. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика : учебное пособие : пер. с англ. ; под ред. В.П. Леонова. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015.
14. Phase I, Open Label Dose Ranging Safety Study of GLS-5300 in Healthy Volunteers ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02670187. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02670187>. (дата обращения: 19.03.20)
15. Safety, Tolerability and Immunogenicity of Vaccine Candidate MVA-MERS-S. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03615911. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03615911>. (дата обращения: 19.03.20)
16. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17 (7): 1055–65. DOI: 10.1128/CVI.00131-10.
17. Медуницын Н.В. Проблемы коррекции иммунитета при вакцинации. *Иммунология.* 2017; 38 (3): 148–54. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-3-148-154.
18. World Health Organisation. WHO Target Product Profiles for MERS-CoV Vaccines. May 2017. URL: https://www.who.int/blueprint/what/research-development/MERS_CoV_TPP_15052017.pdf?ua=1. (дата обращения: 19.03.20)
19. Jia W., Channappanavar R., Zhang C., Li M., Zhou H., Zhang S. et al. Single intranasal immunization with chimpanzee adenovirus-based vaccine induces sustained and protective immunity against MERS-CoV infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8 (1): 760–72. DOI: 10.1080/22221751.2019.1620083.

J. Med. 2013; 369 (4): 394]. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367 (19): 1814–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.

3. World Health Organisation. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2020. URL: <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html>. (date of access March 19, 20)

4. World Health Organisation. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2020. URL: <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html>. (date of access March 19, 20)
5. Memish Z.A., Cotten M., Meyer B., Watson S.J., Alshafi A.J., Al Rabeeah A.A., et al. Human infection with MERS coronavirus after exposure to infected camels, Saudi Arabia, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20 (6): 1012–5. DOI: 10.3201/eid2006.140402.
6. Reusken C.B., Farag E.A., Jonges M., Godeke G.J., El-Sayed A.M., Pas S.D., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19 (23): 208–29. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.23.20829.
7. Cho H., Excler J.L., Kim J.H., Yoon I.K. Development of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus vaccines – advances and challenges. *Hum. Vaccines Immunother.* 2018; 14 (2): 304–13. DOI: 10.1080/21645515.2017.1389362.
8. World Health Organisation. WHO Research and Development Blueprint: 2017 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint. 2017. URL: <http://www.who.int/blueprint/what/research-development/2017-Prioritization-Long-Report.pdf>. (date of access March 19, 20)
9. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21 (3): 346–51. DOI: 10.1016/j.coi.2009.05.016.
10. Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tikhvatulin A.I., Dzharul'eva A.S., Tikhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum. Vaccines Immunother.* 2017; 13 (3): 613–20. DOI: 10.1080/21645515.2016.1238535.
11. Study of Safety and Immunogenicity of BVRS-GamVac-Combi ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04128059. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04128059>. (date of access March 19, 20)
12. Unguryanu T.N., Grzhibovskiy A.M. Brief recommendations on the description, statistical analysis and presentation of data in scientific publications. *Ekologiya cheloveka.* 2011; (5): 55–60. (in Russian)
13. Petri A., Sabin K. Visual medical statistics. Tutorial. Transl. from Engl.; Leonova V.P. (ed.). Moscow: GEOTAR-Media, 2015. (in Russian)
14. Phase I, Open Label Dose Ranging Safety Study of GLS-5300 in Healthy Volunteers ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02670187. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02670187>. (date of access March 19, 20)
15. Safety, Tolerability and Immunogenicity of Vaccine Candidate MVA-MERS-S. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03615911. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03615911>. (date of access March 19, 20)
16. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17 (7): 1055–65. DOI: 10.1128/CVI.00131-10.
17. Medunitsyn N.V. The problem of correction of immunity in vaccination center of expertise of medical application. *Immunologiya.* 2017; 38 (3): 148–54. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-3-148-154. (in Russian)
18. World Health Organisation. WHO Target Product Profiles for MERS-CoV Vaccines. May 2017. URL: https://www.who.int/blueprint/what/research-development/MERS_CoV_TPP_15052017.pdf?ua=1. (date of access March 19, 20)
19. Jia W., Channappanavar R., Zhang C., Li M., Zhou H., Zhang S., et al. Single intranasal immunization with chimpanzee adenovirus-based vaccine induces sustained and protective immunity against MERS-CoV infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8 (1): 760–72. DOI: 10.1080/22221751.2019.1620083.

© Коллектив авторов, 2020

Новиков В.В.^{1,2}, Шумилова С.В.¹, Новиков Д.В.^{1,2}, Алясова А.В.³,
Евсегнеева И.В.⁴, Караулов А.В.⁴

Альтернативные варианты мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 при раке толстой кишки

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородский национальный исследовательский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 603950, г. Нижний Новгород, Российская Федерация

² Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 603950, г. Нижний Новгород, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 603005, г. Нижний Новгород, Российская Федерация

⁴ Федеральное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Альфа-цепь рецептора интерлейкина (ИЛ)-2 кодируется полноразмерной мРНК, имеющей несколько делетированных альтернативных вариантов, функция которых неизвестна. Получение информации о встречаемости альтернативных вариантов мРНК α -цепи ИЛ-2R при раке толстой кишки поможет установить их роль в механизмах противоопухолевого иммунитета.

Цель исследования – определить в крови здоровых лиц и в крови и опухолях пациентов с раком толстой кишки содержание растворимых молекул CD25, полноразмерную форму мРНК ИЛ-2R α (мРНК CD25), кодирующую функционально активную α -цепь рецептора, и формы с делецией 4-го экзона (мРНК CD25Exo4Del) и делецией 4-го и 5-го экзонов (мРНК CD25Exo4-5Del), кодирующие белок, неспособный связывать ИЛ-2 из-за отсутствия 4-го экзона. Сопоставить экспрессию альтернативных вариантов мРНК ИЛ-2R α с экспрессией генов, кодирующих CD38, ICAM-1, Fas и ряд раково-тестикулярных антигенов (MAGEA1-MAGEA6, CT7 (MAGEC1), GAGE1-GAGE8, NY-ESO-1, SSX1,2,4, TRAG3 и XAGE1).

Материал и методы. В работе использованы 49 образцов опухоли и 10 образцов периферической крови пациентов с раком толстой кишки. Исследование проведено методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Показано, что три альтернативных варианта мРНК ИЛ-2R α присутствуют в крови как здоровых лиц, так и пациентов с раком толстой кишки. В опухолях альтернативные варианты мРНК ИЛ-2R α встречались с различной частотой. Чаще всего обнаруживалась мРНК полноразмерной формы, с промежуточной частотой – мРНК CD25Exo4Del и реже всего – мРНК CD25Exo4-5Del. Наблюдалась тенденция к снижению частоты выявления мРНК CD25Exo4-5Del на поздних стадиях заболевания. Выявлено повышение частоты экспрессии ICAM-1 в опухолях, не содержащих мРНК CD25Exo4-5Del, и увеличение уровня растворимых молекул CD25 в сыворотке крови при отсутствии в опухоли мРНК CD25Exo4Del.

Заключение. Установлена регуляторная роль продуктов делетированных форм мРНК ИЛ-2R α , приводящая к активации регуляторных Т-клеток, усилению иммуносупрессии и прогрессии опухолевого роста.

Ключевые слова: альфа-цепь рецептора интерлейкина-2; альтернативные варианты мРНК; рак толстой кишки; регуляторные Т-клетки

Статья поступила 14.01.2020. Принята в печать 20.02.2020.

Для цитирования: Новиков В.В., Шумилова С.В., Новиков Д.В., Алясова А.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В. Альтернативные варианты мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 при раке толстой кишки. Иммунология. 2020; 41 (2): 144–153. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-144-153

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Иммунология ■ Том 41 ■ № 2 ■ 2020

Для корреспонденции
Караулов Александр Викторович –
академик РАН,
доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой
клинической иммунологии
и аллергологии
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова
Минздрава России
(Сеченовский Университет),
Москва, Российская Федерация
E-mail: drkaraulov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

Novikov V.V.^{1,2}, Shumilova S.V.¹, Novikov D.V.^{1,2}, Alyasova A.V.³, Evsegneeveva I.V.⁴,
Karaulov A.V.⁴

Alternative variants of interleukin-2 receptor alpha chain mRNA in colon cancer

¹ Lobachevsky University of Nizhny Novgorod, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 603950, Nizhny Novgorod, Russian Federation

² I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russian Federation

³ Nizhny Novgorod Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 603005, Nizhny Novgorod, Russian Federation

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. The alpha chain of the interleukin-2 receptor is encoded by a full-length mRNA which has several alternatively spliced variants whose function is unknown. Information on the occurrence of alternatives to mRNA alpha chain IL-2R in colon cancer help establish their role in antitumor immunity mechanisms.

The aim of the study was to detect the content of soluble CD25 molecules, a full-length form of IL-2R α mRNA (CD25 mRNA) encoding a functionally active receptor alpha-chain and a form with 4 exon deletion (CD25Exo4Del mRNA) and 4 and 5 exons deletion (CD25Exo4-5Del mRNA) encoding a protein unable to bind interleukin-2. In the blood of healthy individuals and in the blood and tumors of colon cancer patients and compare the expression of IL-2R α mRNA alternative forms with an expression of the genes coding CD38, ICAM-1, Fas and several cancer-testicular antigens (MAGEA1-MAGEA6, CT7 (MAGEC1), GAGE1-GAGE8, NY-ESO-1, SSX1, 2, 4, TRAG3 and XAGE1) expression.

Material and methods. 49 tumor samples and 10 peripheral blood samples of colon cancer are used in the work. The study was carried out by a reverse transcription polymerase chain reaction.

Results. It was shown that three alternative forms of mRNA IL-2R α present in the blood of both healthy individuals and patients with colon cancer. In tumors, alternative mRNAs of IL-2R α were detected with different frequencies. Full-length mRNA was detected most often, CD25Exo4Del mRNA – with an intermediate frequency and CD25Exo4-5Del mRNA – most rarely. There was a tendency to decrease the frequency of CD25Exo4-5Del mRNA detection in the late stages of the disease. ICAM-1 expression frequency in mRNA CD25Exo4-5Del negative tumors was increased, and soluble CD25 molecules serum level in the absence of CD25Exo4Del mRNA in tumor was also increased.

Conclusion. The regulatory role of IL-2R α mRNA deleted forms products leading to regulatory T cells activation, immunosuppression increasing and tumor growth progression was established.

Keywords: interleukin-2 receptor alpha-chain; mRNA alternative variants; colon cancer; regulatory T cells

Received 14.01.2020. Accepted 20.02.2020.

For citation: Novikov V.V., Shumilova S.V., Novikov D.V., Alyasova A.V., Evsegneeveva I.V., Karaulov A.V. Alternative variants of interleukin-2 receptor alpha chain mRNA in colon cancer. *Immunologiya*. 2019; 41 (2): 144–53. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-144-153 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

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

For correspondence
Alexander V. Karaulov –
Academician of RAS,
MD, Professor,
Head of the Department of Clinical
Immunology and Allergology
of I.M. Sechenov First Moscow State
Medical University,
Ministry of Healthcare of the
Russian Federation
(Sechenov University), Moscow,
Russian Federation
E-mail: drkaraulov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

Введение

Хорошо известно, что канцерогенез характеризуется многочисленными изменениями генома и транскриптома опухолевых клеток. В то же время на развитие опухоли принципиальным образом влияет состояние иммунитета, в частности популяционный состав и функ-

циональная активность клеток иммунной системы, инфильтрирующих опухоль. Присутствующие в опухоли лимфоциты гетерогенны по популяционному составу и функциональной нагрузке. Все большее значение отводится субпопуляции регуляторных Т-клеток (Treg), угнетающих иммунный ответ хозяина на антигены

опухоли. Одним из маркеров Трег служит мембранная молекула CD25, которая является α -цепью рецептора интерлейкина (ИЛ)-2 и с высокой плотностью представлена на поверхности Трег. Кроме этой популяции лимфоцитов, молекула CD25 экспрессируется на мембране других популяций активированных лимфоцитов и моноцитов, но с гораздо меньшей плотностью. Имеются также сообщения о присутствии молекулы CD25 на мембране опухолевых клеток [1].

Рецептор ИЛ-2 (IL-2R), обладающий высокой аффинностью, построен из α -, β - и γ -цепей и при связывании ИЛ-2 передает в клетку сигнал к пролиферации. Показано существование ряда альтернативных форм матричной РНК α -субъединицы IL-2R (CD25) [2, 3]. Полноразмерная форма кодирует α -цепь, связывающуюся с ИЛ-2, формы с делецией 4-го экзона способны кодировать α -цепи, не связывающие ИЛ-2 [4]. Ранее нами были разработаны методы, позволяющие определять полноразмерную мРНК IL-2R α (CD25), форму с делецией 4-го экзона (мРНК CD25Exo4Del) и форму с делецией 4-го и 5-го экзонов (мРНК CD25Exo4-5Del) [5]. В доступной научной литературе отсутствует информация о встречаемости альтернативных вариантов мРНК α -цепи IL-2R в опухолях и роли их продуктов в механизмах противоопухолевого иммунитета, их влиянии на развитие новообразований, в том числе при раке толстой кишки.

Целью настоящей работы является изучение роли альтернативных вариантов мРНК α -субъединицы IL-2R в патогенетических механизмах развития рака толстой кишки.

Материал и методы

В исследование были включены 49 образцов опухоли и 10 образцов периферической крови пациентов с раком толстой кишки в возрасте от 45 до 84 лет, проходивших лечение в хирургическом отделении ГБУЗ Нижегородской области «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», а также 10 образцов пери-

ферической крови сопоставимых по возрасту здоровых добровольцев, полученных в клинических лабораториях городских больниц №34 и №5 (Нижний Новгород). Исследования проводились в соответствии с этическими нормами, с письменного информированного согласия пациентов и добровольцев, выполнялись строго в рамках Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Группы пациентов формировали после постановки диагноза на основании клинического, морфологического, эндоскопического, рентгенологического обследования и по результатам оперативного вмешательства. Пациенты были разделены на группы в соответствии со стадией заболевания, локализацией опухоли, степенью дифференцировки клеток опухоли, наличием или отсутствием метастазов (табл. 1).

Работа с кровью и образцами опухолей проводилась по международным правилам работы с биологическим материалом. Кровь брали натощак утром в день операции. Кусочки опухоли размером 2,0 × 2,0 × 2,0 мм иссекали в ходе плановых операций, промывали в физиологическом растворе, помещали в микропробирки, содержащие 500 мкл лизирующего буферного раствора (6 М гуанидинизотиония, 1 % Тритон X-100, 100 мМ ацетат Na, pH 7,0) и хранили при температуре -20 °С до использования. Исследовали также образцы периферической крови, смешанные с лизирующим буферным раствором в соотношении 1 : 1.

Сывороточный уровень суммарной и мономерной фракций растворимых молекул CD25 определяли в соответствии с предложенными ранее методами [6, 7].

Суммарную РНК из клеток выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с последующей преципитацией спиртами [8]. При анализе мРНК IL-2R α синтез кДНК на матрице мРНК и детекцию вариантов сплайсинга мРНК проводили с использованием разработанных ранее праймеров [5]. В качестве стандартных параметров полимеразной цепной реакции (ПЦР) были приняты следующие условия. Первоначальный прогрев

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Клинико-морфологический параметр		Количество образцов (n = 49)
Стадия заболевания	I	10 (20 %)
	II	25 (51 %)
	III	9 (18 %)
	IV	5 (10 %)
Локализация опухоли	Восходящая, поперечная и нисходящая ободочная кишка	10 (20 %)
	Сигмовидная кишка	6 (12 %)
	Ректосигмоидный отдел	7 (14 %)
	Прямая кишка	21 (43 %)
Степень дифференцировки опухоли	Не установлена	5 (14 %)
	Высокая	6 (12 %)
	Умеренная	35 (71 %)
	Низкая	4 (8 %)
Метастазы	Не установлена	4 (8 %)
	Присутствуют	16 (33 %)
	Отсутствуют	33 (67 %)

смеси проводили 1 мин при 94 °С, денатурацию ДНК – 30 сек при 94 °С, элонгацию – 45 сек при 72 °С, окончательную достройку цепей – 5 мин при 72 °С. Количество циклов для первого раунда ПЦР составило 40, для второго – 30. Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле. Учет результатов осуществляли с помощью системы видеодокументирования Vilber Lourmat (Франция).

Для детекции мРНК Fas в реакции обратной транскрипции в качестве затравки использовали олигонуклеотид GR-20 (табл. 2). Детекцию вариантов сплайсинга мРНК Fas проводили методом ПЦР в два раунда. В первом раунде ПЦР использовали праймеры 1F и GR-20 и следующие условия: 35 × (94 °С – 30 сек, 55 °С – 30 сек, 72 °С – 45 сек). При детекции мРНК mFas, Fas del 5, Fas del 4, Fas del 3,4 второй раунд ПЦР проводили с комбинацией праймеров 1F и А. Для обнаружения мРНК sFas, Fas del 4,6, Fas del 3,4,6 во втором раунде ПЦР применяли праймеры 1F и Б. Условия второго раунда ПЦР: 25 × (94 °С – 30 сек, 60 °С – 30 сек, 72 °С – 45 сек).

Обратную транскрипцию мРНК CD38 проводили с использованием праймера CD38-R1. Полученную кДНК амплифицировали в двухраундовой ПЦР. В первом раунде ПЦР использовали праймеры CD38-F1 и CD38-R1 и следующие температурные условия: 94 °С – 30 сек, (94 °С – 30 сек, 57 °С – 30 сек, 72 °С – 45 сек) × 35, 72 °С – 5 мин. Второй раунд ПЦР для одновременной детекции двух форм мРНК CD38 (CD38 и CD38Exo3Del) проводили с праймерами CD38-F2 и CD38-R2 при следующих температурных условиях: 94 °С – 30 сек, (94 °С – 30 сек, 62 °С – 30 сек, 72 °С – 45 сек) × 25, 72 °С – 5 мин.

Синтез кДНК ICAM-1 проводили в реакции обратной транскрипции с праймером R1700. Две альтернативные формы мРНК ICAM-1 определяли с использованием общего прямого праймера F1220. Обратный праймер для детекции мРНК мембранной формы ICAM-1 – R22, для детекции мРНК растворимой формы sICAM-1 – TMR. Детекцию матричной РНК осуществляли в ПЦР при следующих условиях: 94 °С – 30 сек, (94 °С – 30 сек, 66 °С – 45 сек, 72 °С – 60 сек) × 50, 72 °С – 5 мин.

При детекции мРНК раково-тестикулярных генов в качестве затравки в реакции обратной транскрипции применяли смесь олигонуклеотидов, специфичных для мРНК MAGEA1-MAGEA6, CT7 (MAGEC1), GAGE1-GAGE8, NY-ESO-1, SSX1,2,4 и XAGE1, обозначенных R1 (табл. 2). Полученные образцы кДНК амплифицировали, используя метод ПЦР в два раунда для раздельного выявления мРНК каждого из семейств исследуемых белков. Для каждой из тестируемых мРНК проводили 35 циклов первой и 25 циклов второй ПЦР при следующих условиях: 94 °С – 30 сек, 55 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек. Для обнаружения мРНК PAGE1 в первом раунде ПЦР использовали праймеры P-F1 и G-R1, во втором – G-F2 и G-R2. При детекции мРНК TRAG3 в обоих раундах ПЦР применяли прямой праймер T-F [9–11].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica v. 8.0. Анализ

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры для детекции мРНК генов дифференцировочных молекул и раково-тестикулярных генов

Ген	Первичная структура праймеров (5' - 3')
Fas	GR-20: GGATTTAAGGTTGGAGATTCA
	1F: ATCCTGGGCATCTGGACCCCT
	A: TTCCTTTCTCTTCACCCAA
	Б: TTCCTTTCTCTTCACTTCC
CD38	CD38-R1: AAGAAACTTgTCAggTCTgT
	CD38-F1: CTATGGCCAACTGCGAGTTC
	CD38-F2: ATGAGACATGTAGACTGCCA
	CD38-R2: ATCCATTGAGCATCACATGG
ICAM-1	R1700: TGTTCAGTGTGGCACCCTG
	F1220: GAGCTTCGTGTCCTGTATGG
	R22: CTCATACCGGGGGGAGAGCA
	TMR: CTCATACCGGGGGGCTCGCG
MAGEA1-6	MMRP1: ACTGAAGGAGAAGATCTGCC
	MA-R1: GTGCTTGGCCCCCTCTCTTC
	MA-F2: AGGAGAAGATCTGCCWGTGG*
	MA-R2: CTGGAGGCTCCCTGAGGACT
SSX1, 2, 4	SSX-F1: GAGAAGTCCGAAAGGCCTT
	SSX-R1: TTCTTGGGCATGATCTTCGGG
	SSX-F2: AGGTTATGACTAACTAGGT
	SSX-R2: AAGTCATCTGAGGACGTTCA
XAGE1	X-F1: CTAAGTACACGGCGGACA
	X-R1: TTGTTTCAGCTTGTCTTCAT
	X-F2: ATACAGCTGAGATCCCAGTG
	X-R2: TTGTGGTTGCTCTTCACCTG
NY-ESO-1	NY-F1: AGAGCCGCTGCTTGAGTTC
	NY-R1: TCTGCAGCAGTCAGTCGGAT
	NY-F2: CCTGCTTGAGTTCTACCTCG
	NY-R2: GCAGTCAGTCGGATAGTCAG
GAGE1-8	G-F1: ATTGGGCTATGCGGCCCGA
	G-R1: TCCAACAYAGGAGCAGCCTG*
	G-F2: AGCATCTGCAGSTCAAGGGC*
	G-R2: TCTTTTAACTGTGATTGC
PAGE1	P-F1: CGTAGACCAATGATCTATGT
CT7	C-F1: CCTATCCAGTCTCAAGGTG
	C-R1: CAGGACAACCTCTGAGGACTC
	C-F2: AGTGCCAGGAGTCAAGGTTC
	C-R2: GCATATCCTTGTCCCCCATG
TRAG3	T-F: AGAAGCCCTATCAAAGTTCC
	T-R1: TTGTGGTCCCGCTATGGCTC
	T-R2: TCGTTCGGCTGGTCAAGGTG

Примечание. * – для обозначения вырожденных оснований использован общепринятый код: S – C/G, W – T/A, Y – T/C.

различий относительных частот обнаружения мРНК в группах проводили с использованием статистического критерия сравнения пропорций. Для представления исследованных количественных показателей были использованы медиана, 25 и 75 процентиля. Межгрупповой анализ количественных показателей проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. При анализе качественных и количественных признаков различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

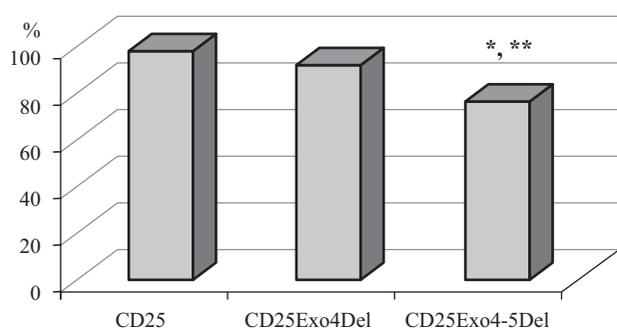


Рис. 1. Частота выявления альтернативных форм мРНК IL-2R α в образцах опухолевых очагов пациентов с раком толстой кишки

* – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК CD25 ($p = 0,002$); ** – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК CD25Exo4Del ($p = 0,032$).

Результаты

Во всех тестируемых образцах периферической крови здоровых доноров и пациентов с раком толстой кишки были обнаружены три альтернативных варианта мРНК α -цепи рецептора ИЛ-2: полноразмерная форма (мРНК CD25), форма с делецией 4-го экзона (мРНК CD25Exo4Del) и форма с делецией 4-го и 5-го экзонов (мРНК CD25Exo4-5Del). Результаты соответствуют литературным данным, полученным ранее при исследовании клеток крови здоровых лиц [12]. При анализе образцов опухолей пациентов с раком толстой кишки обнаружена другая картина. Полноразмерная форма мРНК CD25 была выявлена в 98 % случаев (48 из 49 пациентов) (рис. 1). У пациента без данной формы мРНК CD25 была диагностирована умереннодифференцированная аденокарцинома сигмовидной кишки II стадии.

В одном из тестируемых образцов опухолевых очагов пациентов с раком толстой кишки присутствовала только полноразмерная форма мРНК CD25. У данного пациента была диагностирована низкодифференцированная аденокарцинома восходящего отдела ободочной кишки III стадии развития, обнаружено метастазирование. Матричная РНК с делецией 4-го экзона была детектирована в 92 % тестируемых образцов (45 из 49 пациентов) (см. рис. 1). Четыре пациента, в опухолевых очагах которых не была выявлена мРНК CD25Exo4Del, характеризовались различной локализацией опухолевого процесса (рак прямой кишки, рак сигмовидной кишки, рак восходящего отдела ободочной кишки), степенью дифференцировки опухоли – от низкой до высокой, и стадиями заболевания – от I до III. Три пациента из четырех подверглись операции Гартмана. К моменту операции у них не было обнаружено метастазов. У одного пациента без мРНК CD25Exo4Del были детектированы метастазы. Вариант сплайсинга мРНК IL-2R α без экзонов 4 и 5 в исследуемых образцах обнаружен в 76 % случаев (37 из 49 пациентов). Частота детекции

этого варианта мРНК статистически значимо ниже, чем частота детекции полноразмерной формы мРНК ($p = 0,002$) и формы мРНК CD25Exo4Del ($p = 0,032$).

Три тестируемые альтернативные формы мРНК IL-2R α встречались в опухолях пациентов с раком толстой кишки на всех четырех стадиях заболевания (табл. 3). Полноразмерная форма мРНК CD25 в 100 % случаев выявлена в клетках опухолевых очагов на I, III и IV стадиях. В группе пациента со II стадией рака толстой кишки у одного пациента полноразмерная мРНК отсутствовала. Сплайсинговый вариант мРНК с делецией 4-го экзона в 100 % случаев обнаружен только у пациентов с раком толстой кишки IV стадии. На первых трех стадиях этот вариант мРНК выявлен в 89–92 % случаев. На всех стадиях рака толстой кишки мРНК CD25Exo4-5Del обнаружена с меньшей частотой. На первых трех стадиях частота ее выявления варьировала от 70 до 89 %, а на IV стадии эта форма была определена лишь у двух из пяти тестируемых пациентов (40 %). Различия в частоте обнаружения данной формы мРНК в сравнении с другими на каждой из стадий были статистически недостоверны, что, вероятно, связано с небольшим числом тестируемых пациентов. Тем не менее, наблюдалась выраженная тенденция к уменьшению частоты выявления мРНК CD25Exo4-5Del по сравнению с мРНК CD25 и мРНК CD25Exo4Del на каждой стадии заболевания.

Различия в локализации первичного опухолевого узла и гистологическом типе опухоли не сопровождалось изменениями частоты встречаемости альтернативных форм мРНК CD25 и CD25Exo4Del (табл. 3). Однако наблюдались статистически значимые различия в частоте обнаружения мРНК CD25Exo4-5Del. Она чаще встречалась в опухолевых очагах, локализованных в прямой кишке, чем в ректосигмоидном отделе ($p = 0,012$) и сигмовидной кишке ($p = 0,037$).

При сравнении встречаемости трех форм мРНК IL-2R α в клетках опухолевых очагов между группами пациентов с наличием и отсутствием метастазов статистически значимых различий не обнаружено. Однако наблюдалась тенденция к уменьшению частоты обнаружения мРНК в ряду «CD25 – CD25Exo4Del – CD25Exo4-5Del» у пациентов как с метастазами, так и без них. Частота выявления полноразмерной формы мРНК CD25 была статистически значимо выше, чем частота обнаружения формы мРНК с делецией экзонов 4 и 5 ($p = 0,041$ и $p = 0,015$ соответственно) (см. табл. 3).

Хорошо известно, что ген, кодирующий IL-2R α , является активационным, т.е. его экспрессия значительно повышается в активированных клетках, потенциально способных к пролиферации. Сходным образом ведут себя гены, кодирующие молекулы CD38, ICAM-1 и Fas [13–15]. Для изучения связи между экспрессией гена IL-2RA и генов дифференцировочных молекул CD38, ICAM-1 и Fas была проанализирована экспрессия данных генов в опухолях пациентов, содержащих и не содержащих мРНК CD25Exo4-5Del. В анализ были взяты не только полноразмерные формы мРНК CD38

Таблица 3. Частота обнаружения альтернативных форм мРНК IL-2Ra в опухолях пациентов раком толстой кишки

Характеристика заболевания		мРНК					
		CD25		CD25Exo4Del		CD25Exo4-5Del	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Стадия заболевания	I	10/10	100	9/10	90	7/10	70
	II	24/25	96	23/25	92	20/25	80
	III	9/9	100	8/9	89	8/9	89
	IV	5/5	100	5/5	100	2/5	40
Локализация опухоли	Восходящая, поперечная и нисходящая ободочная кишка	10/10	100	8/10	80	7/10	70
	Сигмовидная кишка	5/6*	83	5/6*	83	3/6	50
	Ректосигмоидный отдел	7/7*	100	7/7*	100	5/7	41
	Прямая кишка	21/21	100	19/21	90	19/21	90
Гистологическая форма	Высокодифференцированная	6/6	100	5/6	83	4/6	67
	Умеренно-дифференцированная	34/35*	97	33/35*	94	27/35	77
	Низкодифференцированная	4/4	100	3/4	75	3/4	75
Метастазы	Есть	16/16 *	100	15/16	94	12/16	75
	Нет	32/33*	97	30/33	91	25/33	76

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК CD25Exo4-5Del ($p < 0,05$).

и ICAM-1 и Fas, но и делетированные варианты мРНК их генов, представленные в табл. 4 [16–19].

Частота обнаружения семи альтернативных форм мРНК Fas, двух форм мРНК CD38 и мРНК ICAM-1 незначительно варьировала между группами пациентов, содержащих и не содержащих мРНК CD25Exo4-5Del в опухолевом очаге. Тем не менее, мРНК ICAM-1 встречалась в 2,1 раза чаще в опухолях, содержащих мРНК CD25Exo4-5Del, чем в CD25Exo4-5Del-негативных опухолях ($p < 0,001$) (см. табл. 4). В соответствии с этим, в опухолях, позитивных по мРНК ICAM-1, чаще, чем в негативных по мРНК ICAM-1, выявлялись мРНК CD25 и CD25Exo4-5Del ($p = 0,032$ и $p < 0,001$) (табл. 5). Показано, что при раке толстой кишки повышенный уровень экспрессии ICAM-1 клетками опухолей ассоциирован с высокодифференцированными новообразованиями, а также с высокой восприимчивостью к лизису цитотоксическими Т-лимфоцитами

[20, 21]. Таким образом, наличие мРНК CD25Exo4-5Del в опухолевых очагах пациентов с раком толстой кишки можно рассматривать как свидетельство благоприятного течения заболевания.

Различий экспрессии раково-тестикулярных генов в опухолевых очагах, содержащих и не содержащих различные варианты мРНК IL-2Ra, не обнаружено (данные не представлены). Наряду с определением мРНК в опухолевых очагах пациентов с раком толстой кишки проведено определение содержания суммарной и олигомерной фракций растворимой молекулы CD25 (sCD25) в сыворотке крови пациентов (табл. 6). Статистически значимых различий содержания суммарной фракции sCD25 в сыворотке крови пациентов с наличием и отсутствием в опухолевых очагах альтернативных форм мРНК IL-2Ra не обнаружено. Статистически значимые различия отсутствовали также при сравнении со здоровыми донорами крови. Результаты указывают на то, что

Таблица 4. Частота обнаружения мРНК дифференцировочных генов в опухолях пациентов с раком толстой кишки

мРНК дифференцировочных генов	мРНК CD25Exo4-5Del			
	присутствует		отсутствует	
	абс.	%	абс.	%
CD38	24/36	67	7/10	70
CD38Exo3Del	10/36	28	2/10	20
ICAM-1	35/37*	95	5/11	45
sICAM-1	11/37	30	3/11	27
mFas	37/37	100	12/12	100
Fas del 5	8/37	22	5/12	42
Fas del 4	10/37	27	3/12	25
Fas del 3, 4	33/37	89	11/12	92
sFas	36/37	97	11/12	92
Fas del 4, 6	17/37	46	7/12	58
Fas del 3, 4, 6	33/37	89	8/12	67

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения мРНК ICAM-1 в CD25Exo4-5Del-негативных опухолях ($p < 0,001$).

особенности экспрессии гена *IL2RA* в опухолевых очагах не отражаются на содержании в сыворотке крови суммарной фракции молекул sCD25, которые, как известно, являются продуктом посттрансляционной модификации белка, образуются путем протеолитического срезания с клеточной мембраны и способны поступать в кровоток, где выполняют супрессорную функцию [22]. Однако в сыворотке крови пациентов, в опухолевых очагах которых не определялась мРНК CD25Exo4Del, выявлена выраженная, хотя и статистически не значимая, тенденция к повышению содержания олигомерной фракции молекул sCD25 в сравнении с пациентами, в опухолевых очагах которых мРНК CD25Exo4Del детектировалась. Кроме того, обнаружено статистически значимое повышение уровня олигомерной фракции в 2,6 раза в сравнении со здоровыми донорами ($p < 0,05$). Этот факт свидетельствует о возможной регуляторной роли мРНК *IL-2R α* , не содержащей в своем составе 4-го экзона, или ее белкового продукта. Можно предположить, что при отсутствии кодируемой мРНК CD25Exo4Del α -цепи, не способной связывать ИЛ-2, резко повышается скорость шеддинга полноразмерной молекулы CD25, а это проявляется в повышении ее концентрации в периферической крови. В результате на системном уровне может возникнуть торможение активационных процессов, основанное на связывании ИЛ-2 растворимыми молекулами CD25.

Как указано выше, все три исследуемые формы мРНК *IL-2R α* были обнаружены в 100 % тестированных

образцов периферической крови как у пациентов с раком толстой кишки, так и у здоровых доноров крови. При этом в опухолевых очагах частота обнаружения всех трех альтернативных форм мРНК *IL-2R α* составила 64 % и оказалась статистически значимо ниже, чем в крови пациентов с раком толстой кишки и доноров крови ($p = 0,046$). Таким образом, в клетках опухолевых очагов части пациентов с раком толстой кишки обнаруживаются изменения в спектре альтернативных форм мРНК *IL-2R α* , отсутствующие в клетках периферической крови. Изменения чаще всего связаны с потерей мРНК, имеющей делецию 4-го и 5-го экзона, и могут принадлежать или непосредственно опухолевым клеткам, или лимфоидным клеткам, инфильтрирующим опухоль.

Обсуждение

По результатам исследования образцов опухолевых очагов пациентов с колоректальным раком, проведенного ранее, мРНК *IL-2R α* была детектирована в 58 % (7/12) случаев, что согласуется с данными, представленными в настоящей работе [20]. Присутствие мРНК *IL-2R α* в опухолевых клетках было показано при ряде других новообразований [23–25].

Данные литературы свидетельствуют, что экспрессия гена *IL-2RA* в раковой клетке является одним из молекулярных механизмов экспансии опухолевых клонов

Таблица 5. Частота обнаружения альтернативных форм мРНК *IL-2R α* в опухолях пациентов с раком толстой кишки

мРНК дифференцировочных и раково-тестикулярных генов	Альтернативные варианты мРНК <i>IL-2Rα</i>					
	CD25		CD25Exo4Del		CD25Exo4-5Del	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
CD38 ⁺	30/31	98	28/31	90	25/31 [^]	81
CD38 ⁻	15/15	100	15/15	100	12/15	80
CD38Exo3Del ⁺	12/12	100	11/12	92	10/12	83
CD38Exo3Del ⁻	33/34	97	32/34 ^{^^}	94	26/34 [^]	76
ICAM-1 ⁺	40/40*	100	38/40	95	35/40*	88
ICAM-1 ⁻	7/8	88	6/8	75	2/8	25
sICAM-1 ⁺	14/14	100	13/14 31/34	93	11/14	79
sICAM-1 ⁻	33/34	97		91	26/34 [^]	77
mFas ⁺	48/49	98	45/49	92	37/49 [^]	76
mFas ⁻	0/0	0	0/0	0	0/0	0
Fas del 5 ⁺	13/13	100	13/13 ^{^^}	100	8/13 [^]	62
Fas del 5 ⁻	35/36	97	32/36	89	29/36 [^]	81
Fas del 4 ⁺	13/13	100	12/13 33/36	92	10/13	77
Fas del 4 ⁻	35/36	97		92	27/36 [^]	75
Fas del 3, 4 ⁺	44/44	100	43/44 ^{^^}	98	33/44 [^]	75
Fas del 3, 4 ⁻	4/5	80	2/5	40	4/5	80
sFas ⁺	46/47	98	43/47	91	36/47 [^]	77
sFas ⁻	2/2	100	2/2	100	1/2	50
Fas del 4, 6 ⁺	24/25	96	22/25 23/24	88	18/25 [^]	72
Fas del 4, 6 ⁻	24/24	100		96	19/24 [^]	79
Fas del 3, 4, 6 ⁺	40/41	98	38/41	93	33/41 [^]	80
Fas del 3, 4, 6 ⁻	8/8	100	7/8	88	4/8 [^]	50

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК в ICAM-1⁻-опухолях ($p < 0,05$); [^] – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК CD25 ($p < 0,05$); ^{^^} – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК CD25Exo4-5Del ($p < 0,05$).

Таблица 6. Уровень суммарной и олигомерной фракций sCD25 в сыворотке крови пациентов с раком толстой кишки (ед/мл)

мРНК		Фракция sCD25	
		суммарная	олигомерная
CD25	Есть	367,7 (313,0; 427,5)	302,3 (266,5; 397,3)
	Нет	273,0	Не тестировали
CD25Exo4Del	Есть	365,8 (305,0; 427,5)	302,3 (261,5; 390,5)
	Нет	369,2 (317,7; 409,3)	1047,0 (271,4; 1822,5)
CD25Exo4-5Del	Есть	355,0 (285,0; 416,0)	292,8 (258,4; 397,3)
	Нет	377,0 (339,2; 433,8)	319,2 (286,0; 437,4)

и ассоциирована с высоким уровнем злокачественности опухоли. Установлено, что высокая экспрессия IL-2RA в неопластических клетках приводит к повышению их пролиферативной, трансформирующей активности, устойчивости к лекарственным препаратам и коррелирует с неблагоприятным прогнозом для пациента [1]. Однако во всех упомянутых случаях анализировалась мРНК IL-2R α полноразмерной формы или ее белковый продукт. Как показано в настоящей работе, в опухолях одновременно в большинстве случаев присутствовали и делетированные формы мРНК. Можно предположить, что кодируемые ими белки конкурируют с полноразмерными α -цепями за включение в состав высокоаффинного рецептора и тем самым осуществляют ограничительную регуляторную функцию. Однако по мере развития опухолевого процесса частота встречаемости мРНК CD25Exo4-5Del падала, достигая минимума на IV стадии. Отсутствие делетированной мРНК должно приводить в этой ситуации к более эффективному связыванию ИЛ-2 и пролиферации клеток, что наблюдается на поздних стадиях опухолевого роста.

Другим источником мРНК IL-2R α в опухолевых очагах пациентов с раком толстой кишки могут быть лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, в частности CD4⁺CD25⁺-Трег [26]. Важной характеристикой CD4⁺CD25⁺-Трег является высокая экспрессия α -цепи рецептора ИЛ-2 на их мембране. Функциональная роль данной субпопуляции клеток заключается в том, что они оказывают мощный регуляторно-супрессирующий эффект на пролиферацию других Т-клеток *in vitro* и подавляют их функции *in vivo*. Активированные CD4⁺-клетки также экспрессируют на своей поверхности молекулу CD25, но временно и в значительно меньших количествах по сравнению с Трег [27].

Нами показано, что три альтернативные формы мРНК IL-2R α в периферической крови пациентов с раком толстой кишки, так же, как и в крови здоровых доноров, определяются в 100 % случаев и, видимо,

таким образом обеспечивают полноценную работу системы «ИЛ-2 – его рецептор». В опухолях делетированные формы мРНК IL-2R α и в первую очередь – мРНК CD25Exo4-5Del выявляются значительно реже. Вероятно, потеря делетированных форм на поздних стадиях заболевания приводит к дисбалансу в содержании альтернативных вариантов мРНК IL-2R α не только в опухолевых клетках, но и в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, в первую очередь – Трег. Причина и механизм формирования такого дисбаланса остаются неясными, однако результатом может стать повышение уровня активации Трег за счет отсутствия на мембране продуктов делетированных форм мРНК IL-2R α , не способных связывать ИЛ-2 и играющих роль ограничителя количества функционально активных рецепторов ИЛ-2. Усиление супрессорной активности Трег, как известно, служит одной из причин прогрессии опухоли. Для проверки изложенных предположений необходимы дополнительные исследования.

Заключение

Продемонстрировано присутствие альтернативных форм мРНК IL-2R α CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del в опухолевых очагах и периферической крови пациентов с раком толстой кишки. Представлены данные о частоте их выявления и частоте выявления полноразмерной формы мРНК CD25 в опухолевых очагах пациентов с различными гистологическими формами рака толстой кишки, на различных стадиях заболевания, при различной локализации опухоли, при метастазах, в сравнении с особенностями транскриптома клеток опухолевых очагов и уровнем растворимой формы дифференцировочной молекулы CD25 в сыворотке крови. Полученные данные позволяют высказать предположение о регуляторной роли продуктов делетированных форм мРНК IL-2R α , отсутствие которых в опухолевых очагах пациентов с раком толстой кишки может приводить к активации Трег, усилению иммуносупрессии и прогрессии опухоли.

Литература

1. Kuhn D.J., Dou Q.P. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. *Front. Biosci.* 2005; 10: 1462–74. DOI: 10.2741/1631.
2. Cosman D. Cloning, sequence and expression of human interleukin-2 receptor. *Nature.* 1984; 312 (5996): 768–71. DOI: 10.1038/312768a0.
3. Castrignano T., D'Antonio M., Anselmo A. Carrabino D. et al. ASPicDB: a database resource for alternative splicing analysis. *Bio-*

informatics. 2008; 24 (10): 1300–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn113.

4. Ishida N., Kanamori H., Noma T., Nikaido T. et al. Molecular cloning and structure of the human interleukin 2 receptor gene. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13 (21): 7579–89. DOI: 10.1093/nar/13.21.7579.

5. Новикова С.В. (Шумилова С.В.), Алясова А.В., Новиков Д.В. Разработка и апробация метода детекции мРНК альфа-цепи ре-

цептора интерлейкина-2 в клетках опухолевых очагов человека. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2010; 2 (2): 563–65.

6. Kubysheva N., Postnikova L., Soodaeva S., Novikov V. et al. Relationship of the content of systemic and endobronchial soluble molecules of CD25, CD38, CD8, and HLA-I-CD8 and Lung function parameters in COPD patients. *Dis. Markers*. 2017. Vol. 2017. DOI:10.1155/2017/8216723.

7. Novikov V.V., Egorova N.I., Kurnikov G.Yu., Evsegneeva I.V. The Serum level of soluble HLA molecules and IL-2R at urogenital chlamydial infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 601: 285–89.

8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162 (1): 156–59. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

9. Новиков В.В., Евсегнеева И.В. Новые дифференцировочные антигены человека, утвержденные на VII Международном Воркшопе. *Российский биотерапевтический журнал*. 2003; 2 (3): 3–6.

10. Голышко П.В., Новиков Д.В., Ананьев С.В., Барышников К.А. и др. Раково-тестикулярные гены в крови и опухоли больных колоректальным раком. *Российский биотерапевтический журнал*. 2015; 1: 19–25.

11. Новиков Д.В., Белова Т.В., Пегов Р.Г., Алясова А.В. и др. Частота обнаружения мРНК MAGE-A1-A6 в крови онкологических больных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; 4: 25–7.

12. Choi C. Homo sapiens interleukin-2 receptor mRNA, alternatively spliced, partial CDS. In: Submitted Neurology. Shinchondong, South Korea : Yonsei University, 1997. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF008556.1>.

13. Nagata S., Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995; 267: 1449–56. DOI: 10.1126/science.7533326.

14. Deaglio S., Mehta K., Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk. Res.* 2001; 25 (1): 1–12. DOI: 10.1016/s0145-2126(00)00093-x.

15. Wingren A.G., Parra E., Varga M., Kalland T. T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit. Rev. Immunol.* 2017; 37 (2-6): 463–81. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v15.i3-4.30

16. Perenkov A.D., Novikov D.V., Sakharnov N.A. et al. Heterogeneous CD38 expression in tumor tissues of patients with colorectal cancer. *Mol. Biol.* 2012; 46 (5): 705–9.

17. Новиков Д.В., Фомина С.Г., Гурина Н.Н., Перенков А.Д. и др. Корреляция экспрессии MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A и FoxP3 в опухолевых очагах больных раком молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 1: 37–41.

18. Голеньков А.К., Митина Т.А., Новиков В.В. и др. Клиническое значение растворимых молекул адгезии (sCD50-ICAM-3), апоптоза (sCD95) и sHLA класса I при лимфопролиферативных заболеваниях. *Российский биотерапевтический журнал*. 2002; 1 (1): 60–4.

19. Уткин О.В., Свинцова Т.А., Кравченко Г.А., Шмелева О.А. и др. Экспрессия альтернативных форм гена CD95/FAS в клетках крови при герпес-вирусной инфекции. *Иммунология*. 2012; 33 (4): 189–93.

20. Wang Q., Li B., Liu B., Liu Y.B. et al. Polymorphisms of the ICAM-1 exon 6 (E469K) are associated with differentiation of colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2009; 28: 139–45. DOI: 10.1186/1756-9966-28-139.

21. Hamai A., Meslin F., Benhalam H., Jalil A. et al. ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer Res.* 2008; 68 (23): 9854–64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0719.

22. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. Москва : Медицинское информационное агентство. 2008: 249 с.

23. García-Tuñón I., Ricote M., Ruiz A., Fraile B. et al. Interleukin-2 and its receptor complex (alpha, beta and gamma chains) in situ and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study. *Breast Cancer Res.* 2004; 6 (1): R1–7. DOI: 10.1186/bcr730.

24. Loose D., Signore A., Bonanno E., Vermeersch H. et al. Prognostic value of CD25 expression on lymphocytes and tumor cells in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2008; 23 (1): 25–33. DOI: 10.1089/cbr.2007.0373.

25. McDoniels-Silvers A.L., Stoner G.D., Lubet R.A., You M. Differential expression of critical cellular genes in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas in comparison to normal lung tissues. *Neoplasia*. 2002; 4 (2): 141–50. DOI: 10.1038/sj.neo.7900217.

26. Guoping D. Tumor-infiltrating regulatory T cells: origins and features. *Am. J. Exp. Immunol.* 2018; 7 (5): 81–7.

27. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2001; 167 (3): 1245–53. DOI: 10.4049/jimmunol.167.3.1245.

■ References

1. Kuhn D.J., Dou Q.P. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. *Front. Biosci.* 2005; 10: 1462–74. DOI: 10.2741/1631.

2. Cosman D. Cloning, sequence and expression of human interleukin-2 receptor. *Nature*. 1984; 312 (5996): 768–71. DOI: 10.1038/312768a0.

3. Castrignano T., D'Antonio M., Anselmo A. Carrabino D., et al. ASPicDB: a database resource for alternative splicing analysis. *Bioinformatics*. 2008; 24 (10): 1300–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn113.

4. Ishida N., Kanamori H., Noma T., Nikaido T., et al. Molecular cloning and structure of the human interleukin 2 receptor gene. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13 (21): 7579–89. DOI: 10.1093/nar/13.21.7579.

5. Novikova S.V. (Schumilova S.V.), Alyasova A.V., Novikov D.V. Development and testing of the method of detection of alpha-chain mRNA of interleukin-2 receptor in cells of human tumors. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*. 2010; 2 (2): 563–65. (in Russian)

6. Kubysheva N., Postnikova L., Soodaeva S., Novikov V., et al. Relationship of the content of systemic and endobronchial soluble molecules of CD25, CD38, CD8, and HLA-I-CD8 and Lung function parameters in COPD patients. *Dis. Markers*. 2017. Vol. 2017. DOI:10.1155/2017/8216723.

7. Novikov V.V., Egorova N.I., Kurnikov G.Yu., Evsegneeva I.V. The Serum level of soluble HLA molecules and IL-2R at urogenital chlamydial infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 601: 285–89.

8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162 (1): 156–59. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

9. Novikov V.V., Evsegneeva I.V. New human differentiation antigens approved at the VII International Workshop. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2003; 2 (3): 3–6. (in Russian)

10. Golyshko P.V., Novikov D.V., Ananiev S.V., Baryshnikov K.A., et al. Cancer-testicular genes in patients with colorectal cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2015; 1: 19–25. (in Russian)

11. Novikov D.V., Belova T.V., Pegov R.G., Alyasova A.V., et al. The frequency of mRNA detection is MAGE-A1-A6 in the blood of oncological patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2009; 4: 25–7. (in Russian)

12. Choi C. Homo sapiens interleukin-2 receptor mRNA, alternatively spliced, partial CDS. In: Submitted Neurology. Shinchondong, South Korea : Yonsei University, 1997. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF008556.1>.

13. Nagata S., Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995; 267: 1449–56. DOI: 10.1126/science.7533326.

14. Deaglio S., Mehta K., Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk. Res.* 2001; 25 (1): 1–12. DOI: 10.1016/s0145-2126(00)00093-x.

15. Wingren A.G., Parra E., Varga M., Kalland T. T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit. Rev. Immunol.* 2017; 37 (2-6): 463–81. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v15.i3-4.30

16. Perenkov A.D., Novikov D.V., Sakharnov N.A., et al. Heterogeneous CD38 expression in tumor tissues of patients with colorectal cancer. *Mol. Biol.* 2012; 46 (5): 705–9.

17. Novikov D.V., Fomina S.G., Gurina N.N., Perenkov A.D., et al. Correlation of expression of MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A and FoxP3 in tumor centers of breast cancer patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 1: 37–41. (in Russian)

18. Golenkov A.K., Mitina T.A., Novikov V.V., et al. Clinical significance of soluble adhesion molecules (sCD50-ICAM-3), apoptosis (sCD95) and class I sHLA in lymphoproliferative diseases. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2002; 1 (1): 60–4. (in Russian)

19. Utkin O.V., Svintsova T.A., Kravchenko G.A., Shmeleva O.A., et al. Expression of alternative forms of gene CD95/FAS in blood cells at herpesviral infection. *Immunologiya*. 2012; 33 (4): 189–93. (in Russian)

20. Wang Q., Li B., Liu B., Liu Y.B., et al. Polymorphisms of the ICAM-1 exon 6 (E469K) are associated with differentiation of colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2009; 28: 139–45. DOI: 10.1186/1756-9966-28-139.

21. Hamai A., Meslin F., Benhalem H., Jalil A., et al. ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer Res.* 2008; 68 (23): 9854–64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0719.

22. Novikov V.V., Karaulov A.V., Baryshnikov A.Y. Soluble forms of membrane antigens of immune system cells. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2008: 249 p.

23. García-Tuñón I., Ricote M., Ruiz A., Fraile B., et al. Interleukin-2 and its receptor complex (alpha, beta and gamma chains) in situ

and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study. *Breast Cancer Res.* 2004; 6 (1): R1–7. DOI: 10.1186/bcr730.

24. Loose D., Signore A., Bonanno E., Vermeersch H., et al. Prognostic value of CD25 expression on lymphocytes and tumor cells in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2008; 23 (1): 25–33. DOI: 10.1089/cbr.2007.0373.

25. McDoniels-Silvers A.L., Stoner G.D., Lubet R.A., You M. Differential expression of critical cellular genes in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas in comparison to normal lung tissues. *Neoplasia*. 2002; 4 (2): 141–50. DOI: 10.1038/sj.neo.7900217.

26. Guoping D. Tumor-infiltrating regulatory T cells: origins and features. *Am. J. Exp. Immunol.* 2018; 7 (5): 81–7.

27. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2001; 167 (3): 1245–53. DOI: 10.4049/jimmunol.167.3.1245.

© Коллектив авторов, 2020

Галицкая М.А.¹, Курбачёва О.М.¹, Шиловский И.П.¹, Никольский А.А.¹,
Никонова А.А.^{1,2}, Дынева М.Е.¹, Хаитов М.Р.¹

Некоторые особенности воспаления у пациентов с atopической бронхиальной астмой при воздействии респираторных вирусов

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Министерства высшего образования и науки Российской Федерации, 105064, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Современная трактовка патогенеза бронхиальной астмы (БА) подчеркивает роль системного воспаления при БА, так как его развитие под воздействием специфических (аллергены) и неспецифических факторов приводит к нарушению баланса про- и противовоспалительных цитокинов в дыхательных путях. Установлено, что большинство обострений БА возникают при влиянии респираторной вирусной инфекции (РВИ). Процесс воспаления в респираторном тракте при вирус-индуцированных обострениях БА зависит от вида респираторного вируса, а также от фенотипа и эндотипа БА у пациента. На основании исследований *in vitro* и *in vivo* описана роль интерлейкина-33 (ИЛ-33) в патогенезе обострения atopической БА модели на мышах.

Цель исследования – определение экспрессии гена *IL33* и изучение роли ИЛ-33 в развитии atopической БА и при ее вирус-индуцированном обострении у человека.

Материал и методы. В исследование отобраны добровольцы, которые были распределены на группы: «БА», «БА+РВИ», «РВИ», здоровые доноры. Всем участникам исследования проведено клиническое, лабораторное, инструментальное (спирометрия), аллергологическое, иммунологическое обследование (определение экспрессии мРНК гена *IL33* в периферической венозной крови и детекция мРНК респираторных вирусов (РСВ, РВ, коронавирусы, вирусы гриппа типа А и В, метапневмовирусы, аденовирусы, бокавирусы, вирусы парагриппа 1, 2, 3, 4-го типа) в мазках из полости носа методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Результаты. В группах «БА» и «БА+РВИ» отмечали уменьшение $ОФВ_1$, увеличение показателя АСQ-7 (более 1,5 балла), эозинофилии крови ($P = 0,000002$), что характеризует неконтролируемое течение и обострение atopической БА у добровольцев. Наиболее высокий уровень экспрессии мРНК *IL33* детектировался в группе «БА+РВИ» ($P = 0,003$), а при отсутствии РВИ у пациентов с обострением atopической БА фиксировался уровень ИЛ-33, не отличающийся от здоровых доноров. По результатам нашего исследования более тяжелое течение atopической БА отмечалось в сезон с преобладанием РСВ-инфекции в 2017 г. по сравнению с 2016 г. по данным АСQ-7 ($P = 0,00004$ и $P = 0,0002$) и $ОФВ_1$ ($P = 0,006$ и $P = 0,008$) соответственно.

Заключение. Результаты исследования представляют дополнительные доказательства роли провоспалительного ИЛ-33 в патогенезе РВИ и вирус-индуцированных обострений atopической БА (чаще всего РСВ и РВ). Выявление новых механизмов вирус-индуцированных обострений atopической БА может быть использовано при подборе и разработке персонализированной базисной противоастматической терапии.

Ключевые слова: бронхиальная астма; интерлейкины; цитокины; респираторная вирусная инфекция; респираторно-синцитиальные вирусы; риновирусы

Статья поступила 14.01.2020. Принята в печать 20.02.2020.

Для цитирования: Галицкая М.А., Курбачёва О.М., Шиловский И.П., Никольский А.А., Никонова А.А., Дынева М.Е., Хаитов М.Р. Некоторые особенности воспаления у пациентов с atopической бронхиальной астмой при воздействии респираторных вирусов. Иммунология. 2020; 41 (2): 154–163. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-154-163

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-15-00272.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Галицкая Мариола Александровна –
аспирант
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»
ФМБА России, Москва,
Российская Федерация
E-mail: galitskaya.mariola@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2686-024X>

Galitskaya M.A.¹, Kurbacheva O.M.¹, Shilovskiy I.P.¹, Nikolsky A.A.¹,
Nikonova A.A.^{1,2}, Dyneva M.E.¹, Khaitov M.R.¹

Several features of inflammation at the patients with atopical bronchial asthma when exposed to respiratory viruses

¹ National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

² I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Ministry of High Education and Science of the Russian Federation, 105064, Moscow, Russian Federation

Abstract

The modern interpretation of the pathogenesis bronchial asthma (BA) emphasizes the role of systemic inflammation at the BA, since its development under the influence of specific (allergens) and non-specific factors leads to an imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines in the airways. It has been established that most exacerbations of BA occur due to the influence of respiratory viral infection (RVI). The process of inflammation in the airways with virus-induced exacerbations of BA depends on the type of respiratory virus, and also phenotype and endotype of BA at the patient. Based on *in vitro* and *in vivo* studies, the role of interleukin-33 (IL-33) in the pathogenesis exacerbation of atopical BA in the mouse model is described.

The aim of our work is to determine the *IL33* gene expression and study its role during development of atopical BA and its virus-induced exacerbation in humans.

Material and methods. All volunteers included in the study were divided into groups: «BA», «BA+RVI», «RVI», «healthy donors». All study participants underwent clinical, laboratory, instrumental (spirometry), allergological, immunological examination (determination the expression mRNA of the *IL33* gene in peripheral venous blood and identification the mRNA of respiratory viruses (RSV, RV, coronaviruses, influenza virus type A and B, metapneumoviruses, adenoviruses, bokaviruses, parainfluenza viruses type 1, 2, 3, 4) in smears from the nasal cavity by RT-PCR).

Results. In the «BA» and «BA+RVI» groups were observed the decrease FEV₁, increased the ACQ-7 (more than 1.5 points), the blood eosinophilia (P = 0.000002), which characterizes the uncontrolled course and exacerbation of atopical BA from volunteers. The highest level of the expression mRNA IL-33 was found at the «BA+RVI» group (P = 0.003), and in the absence of RVI in volunteers with exacerbation of atopical BA the level of IL-33 not differs from healthy donors. According to the results of our study the more severe course of atopical BA was observed in the season with a predominance of RSV infection in 2017 compared to 2016 according to ACQ-7 (P = 0.00004 and P = 0.0002) and FEV₁ (P = 0.006 and P = 0.008), respectively.

Conclusions. The results of the study provide additional evidence of the role of pro-inflammatory IL-33 in the pathogenesis of RVI and virus-induced exacerbations of atopical BA (most often RSV and RV). Identification of new mechanisms of virus-induced exacerbations of atopical BA can be used in the selection and development of personalized basic therapy of asthma.

Keywords: bronchial asthma; interleukins; cytokines; respiratory viral infection; respiratory syncytial viruses; rhinoviruses

Received 14.01.2020. Accepted 20.02.2020.

For citation: Galitskaya M.A., Kurbacheva O.M., Shilovskiy I.P., Nikolsky A.A., Nikonova A.A., Dyneva M.E., Khaitov M.R. Several features of inflammation at the patients with atopical bronchial asthma when exposed to respiratory viruses. *Immunologiya*. 2019; 41 (2): 154–63. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-154-163 (in Russian)

Funding. Work was financially supported by the Russian Science Foundation grant No. 19-15-00272.

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

Введение

Бронхиальная астма (БА) на сегодняшний день является одним из самых распространенных воспалительных заболеваний дыхательных путей [1]. Распространенность БА в России среди взрослого населения составляет 6,9 %, а среди детей и подростков – около

10 % [2, 3]. БА снижает качество жизни и трудоспособность пациентов, а также приводит к существенным экономическим потерям для государства. Одним из нежелательных исходов течения БА являются обострения патологического процесса, в случае развития которых пациенты вынуждены обращаться за помощью

For correspondence
Mariola A. Galitskaya –
Postgraduate Student,
NRC Institute of Immunology
FMBA of Russia,
Moscow, Russian Federation
E-mail: galitskaya.mariola@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2686-024X>

в стационары и отделения неотложной терапии, оставаться нетрудоспособными в течение существенного промежутка времени. Каждое обострение БА снижает функциональный резерв легких пациентов, требует увеличения дозы ингаляционных глюкокортикостероидов в базисной терапии и назначения системных стероидов, обладающих в том числе рядом побочных действий [4]. Более того, именно обострения БА становятся основной причиной смертности от данного заболевания. Следовательно, необходимо разрабатывать комплекс мер для снижения количества обострений БА, так как каждый такой эпизод является риском нежелательных исходов для пациента [1].

Особое внимание уделяется роли хронического воспаления в дыхательных путях при БА, которое клинически проявляется возникновением респираторных симптомов при влиянии этиологических и других триггерных факторов. Важно понимать, что существует взаимовлияние системного и локального воспалительного процесса при БА. При первом взаимодействии со специфическими (аллергены) и неспецифическими факторами происходит первичная дисрегуляция про- и противовоспалительных цитокинов, в дальнейшем формируется системное и локальное воспаление, и их персистирование в конечном счете приводит к развитию гиперреактивности и ремоделирования бронхов [1]. Изменения цитокинового спектра в дыхательных путях с преобладанием провоспалительных цитокинов поддерживают системное персистирующее воспаление при БА.

Рассматривая подходы к противоастматической терапии, ученые делали акцент на двух патофизиологических аспектах: модификации дыхательных путей и происходящих в них воспалительных иммунологических процессах [5]. Недавние исследования указывают на значительную роль Т2-цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13) в патогенезе БА, что способствовало развитию антицитокиновой противоастматической терапии [6]. Несмотря на это, продолжается активный поиск новых молекул-мишеней, участвующих в патогенезе БА [5], при воздействии на которые возможно появление терапевтического эффекта.

В научных публикациях рассматривается возможная детерминирующая роль провоспалительного цитокина ИЛ-33 в развитии аллергических заболеваний [7, 8]. Он является новым членом семейства цитокинов ИЛ-1. ИЛ-33 реализует свою функциональную роль за счет связывания со специфическим первичным рецептором ST2 и дополнительным белком корецептора ИЛ-1 (IL-1RAcP) [9]. Известно, что растворимый ИЛ-33 увеличивает секрецию Т2-цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13) и действует как хемоаттрактант для Т2-лимфоцитов как *in vivo*, так и *in vitro*. ИЛ-33 участвует в патогенезе многих иммунопатологических состояний: артрита, анафилактического шока, аутоиммунных заболеваний и др. [10]. Участие ИЛ-33 в патогенезе атопической БА было выявлено и подтверждено исследованиями на различных животных моделях [11].

Респираторные вирусы, такие как риновирусы (RV), респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) человека, являются основными причинами обострения БА [12]. Высокпатогенные штаммы респираторных вирусов вызывают тяжелое повреждение легких, а инфицированные клетки продуцируют большое количество провоспалительных цитокинов и хемокинов, что может вызвать среднее или тяжелое обострение БА [6,13].

В связи с недостаточной информацией о функциональном значении ИЛ-33 при обострении атопической БА, вызванном воздействием РВИ, мы попытались провести исследование, наблюдая за пациентами с атопической БА.

Материал и методы

Критерии включения/исключения добровольцев в исследование

Работа проведена на базе отделения «Бронхиальная астма» клиники ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России с 2016 по 2017 г. Участие в исследовании являлось добровольным, набор пациентов в основном проводился на амбулаторном приеме, а также в условиях стационара в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. Исследование было одобрено локальным комитетом по этике. До включения в исследование добровольцы давали свое устное и письменное согласие (форма информации для больного и информированного согласия). После подписания информированного согласия на участие в исследовании всем добровольцам проводилось скрининговое обследование.

Критерии включения добровольцев в исследование:

1. Возраст от 18 до 75 лет, подписанное информированное согласие, способность к адекватному сотрудничеству в процессе исследования.

2. Для групп «БА» и «БА+РВИ» – анамнез атопической БА средней и тяжелой степени тяжести не менее двух лет.

3. Для групп «БА+РВИ» и «РВИ» – симптомы РВИ в течение последних семи дней.

4. Для групп «БА» и здоровые доноры – отсутствие симптомов РВИ в течение последних 30 дней.

Критерии исключения добровольцев из исследования:

1. Для всех групп пациентов: паразитарная инвазия в течение последних 6 мес, туберкулез легких (активная и неактивная формы), онкопатология, системная стероидная терапия, антилейкотриеновая терапия, беременность, лактация, наличие других заболеваний дыхательных путей или острых состояний, способных существенно повлиять на результат исследования; нежелание пациента принимать дальнейшее участие в исследовании.

2. Для групп «БА» и здоровые доноры – наличие симптомов РВИ в течение последних 30 дней.

Добровольцы ($n = 48$), включенные в исследование в 2016 г., были распределены в четыре группы: «БА» ($n = 25$), «БА+РВИ» ($n = 6$), «РВИ» ($n = 9$), здоровые

доноры ($n = 8$). Добровольцы ($n = 51$), включенные в исследование в 2017 г., были также распределены в четыре группы: «БА» ($n = 13$), «БА+РВИ» ($n = 10$), «РВИ» ($n = 11$), здоровые доноры ($n = 17$). Соответственно, за 2016 и 2017 гг. в исследование были включены 99 добровольцев.

Скрининговое обследование добровольцев

Скрининговое клиническое обследование включало регистрацию субъективных жалоб, анамнез заболевания, аллергологический анамнез [перенесенные и сопутствующие системные заболевания; медикаментозная терапия на момент включения в исследование (все системные и топические препараты); данные о наличии лекарственной аллергии]; демографические данные (пол, возраст) (табл. 1).

Проводили анкетирование участников исследования с помощью опросника контроля астмы (Asthma Control Questionnaire, ACQ-7), затем его результат в баллах (сумма баллов/7) оценивали как субъективный критерий контроля БА по мнению пациента.

Аллергологическое обследование всем участникам исследования проводили методом скарификационного кожного тестирования с диагностическими водно-солевыми небактериальными аллергенами. Добровольцам из групп «БА» и «БА+РВИ» с подтвержденной атопией клинически и анамнестически проведено исследование образцов сыворотки крови для определения аллерген-специфических IgE с помощью тест-системы ImmunoCAP Phadia к небактериальным аэроаллергенам [домашняя пыль (h1, h2), пылевые клещи (*D. pteronyssinus* – d1, *D. farinae* – d2), кошка (e1), собака (e5), смесь пыльцы деревьев (tx1), смесь пыльцы луговых трав (gx1), смесь сорных трав (wx7)].

Инструментальное обследование добровольцев

Инструментальное обследование включало проведение и оценку функции внешнего дыхания (объем форсированного дыхания за 1 сек, ОФВ₁) с помощью спирометра (MasterScreen IOS spirometer, CareFusion, Германия). Также всем добровольцам проводили клинический анализ крови с определением лейкоцитарной формулы (гепаринизированная венозная кровь по 10 мл на аппарате Beckman Coulter LH500 Hematology Analyzer, США).

Идентификация респираторных вирусов

У каждого включенного в исследование добровольца брали мазок из слизистой оболочки носовой полости для последующего выделения общей РНК с использо-

ванием коммерческого набора RNase mini kit (Qiagen, Германия). Идентификацию респираторных вирусов (РСВ, РВ, коронавирусы, вирусы гриппа типа А и В, метапневмовирусы, аденовирусы, бокавирусы, вирусы парагриппа 1, 2, 3, 4-го типа) осуществляли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием набора «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL», согласно инструкции производителя (ИнтерЛабСервис, Москва).

Оценка уровня экспрессии цитокинов в мононуклеарах периферической крови

Периферическую кровь отбирали в специальные гепаринизированные пробирки для последующего выделения мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) методом разделения на фиколле. Клетки засеивали в 12-луночный планшет в количестве 5 млн в 1 мл на лунку и в течение суток стимулировали фитогеммагглютинином (ФГА) 20 мкг/мл. Затем клетки лизировали в буфере RLT и выделяли РНК как описано выше. Синтез кДНК осуществляли набором ОТ-1 («Синтол», Москва) согласно инструкции производителя. Экспрессию гена *IL33* оценивали методом ПЦР-РВ.

Статистический анализ данных

Статистический анализ полученных данных проводили при помощи пакета статистических программ Statistica 12.0. На основании W-критерия Шапиро–Уилка проверялась нормальность распределения представленных групп. В ходе анализа было получено, что данные выборки не подчиняются нормальному распределению, поэтому их приводили в виде медианы и верхнего и нижнего квартилей [Me , ($Q_{25\%}$; $Q_{75\%}$)], а также указывали максимальные и минимальные значения.

Сравнение независимых групп проводилось с помощью H -критерия Краскела–Уоллиса для оценки значимой межгрупповой изменчивости более чем в двух группах, различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. В дальнейшем сравнение между группами проводилось с учетом поправки Бонферрони при оценке значения P (различия считались статистически значимыми при $P \leq 0,008$) с помощью U -критерия Манна–Уитни.

Результаты

Спектр сенсibilизации и респираторных вирусных патогенов у обследованных добровольцев

У всех добровольцев групп «БА» ($n = 38$) и «БА+РВИ» ($n = 16$) выявлена полисенсibilизация по данным аллергоанамнеза и результатам кожного аллер-

Таблица 1. Демографическая характеристика участников исследования

Группа	Пол		Средний возраст, годы
	мужской	женский	
«БА», $n = 38$	16	22	40,0 [32,0;53,0]
«БА+РВИ», $n = 16$	6	10	59,0 [33,0;62,0]
«РВИ», $n = 20$	8	12	27,0 [23,0;33,0]
Здоровые доноры, $n = 25$	8	17	26,0 [24,0;29,0]

гологического тестирования. Все добровольцы имели сенсibilизацию к круглогодичным аллергенам (домашняя пыль и ее компоненты, эпидермальные аллергены), часть из них были сенсibilизированы и к пыльцевым аллергенам. Для выявления преобладающего причинно-значимого аллергена у добровольцев групп «БА» ($n = 13$) и «БА+РВИ» ($n = 10$) в 2017 г. с помощью генератора случайных чисел отобрано по 7 образцов сыворотки крови из каждой группы, в которых были определены аллерген-специфические IgE-антитела к небактериальным аэроаллергенам. Следовательно, объективно подтверждена атопия и выявлены высокие значения аллерген-специфических IgE, соответствующих клинической картине гиперчувствительности каждого добровольца с атопической БА. Распределение полисенсibilизации среди добровольцев группы «БА» выглядело следующим образом: бытовая (домашняя пыль 100 %), пыльцевая (пыльца деревьев 85,71 %, пыльца злаковых трав

85,71 %, пыльца сорных трав 28,57 %), эпидермальная (кошка 71,42 %, собака 57,14 %) сенсibilизация. При этом в группе «БА+РВИ» распределение сенсibilизации было следующим: бытовая (домашняя пыль 71,42 %), эпидермальная (кошка 42,85 %, собака 42,85 %), пыльцевая (пыльца деревьев 42,86 %, пыльца злаковых трав 28,57 %, пыльца сорных трав 28,57 %) сенсibilизация (рис. 1А).

Анализируя данные ПЦР-РВ в мазках из полости носа в группах «БА+РВИ» и «РВИ», мы отметили, что за весь период наблюдения среди изучаемых респираторных вирусов преобладали РСВ и РВ (рис. 1Б). В 2016 г. в группе «БА+РВИ» ($n = 6$) вирусные патогены были представлены следующим образом: РВ (36,4 %), РСВ (36,4 %), вирус парагриппа человека типа 1 (9,1 %) и коронавирусы (18,2 %); а в группе «РВИ» ($n = 9$): РВ (42,9 %), коронавирусы (35,7 %), РСВ (7,1 %), вирус парагриппа человека типа 3 (7,1 %) и ви-

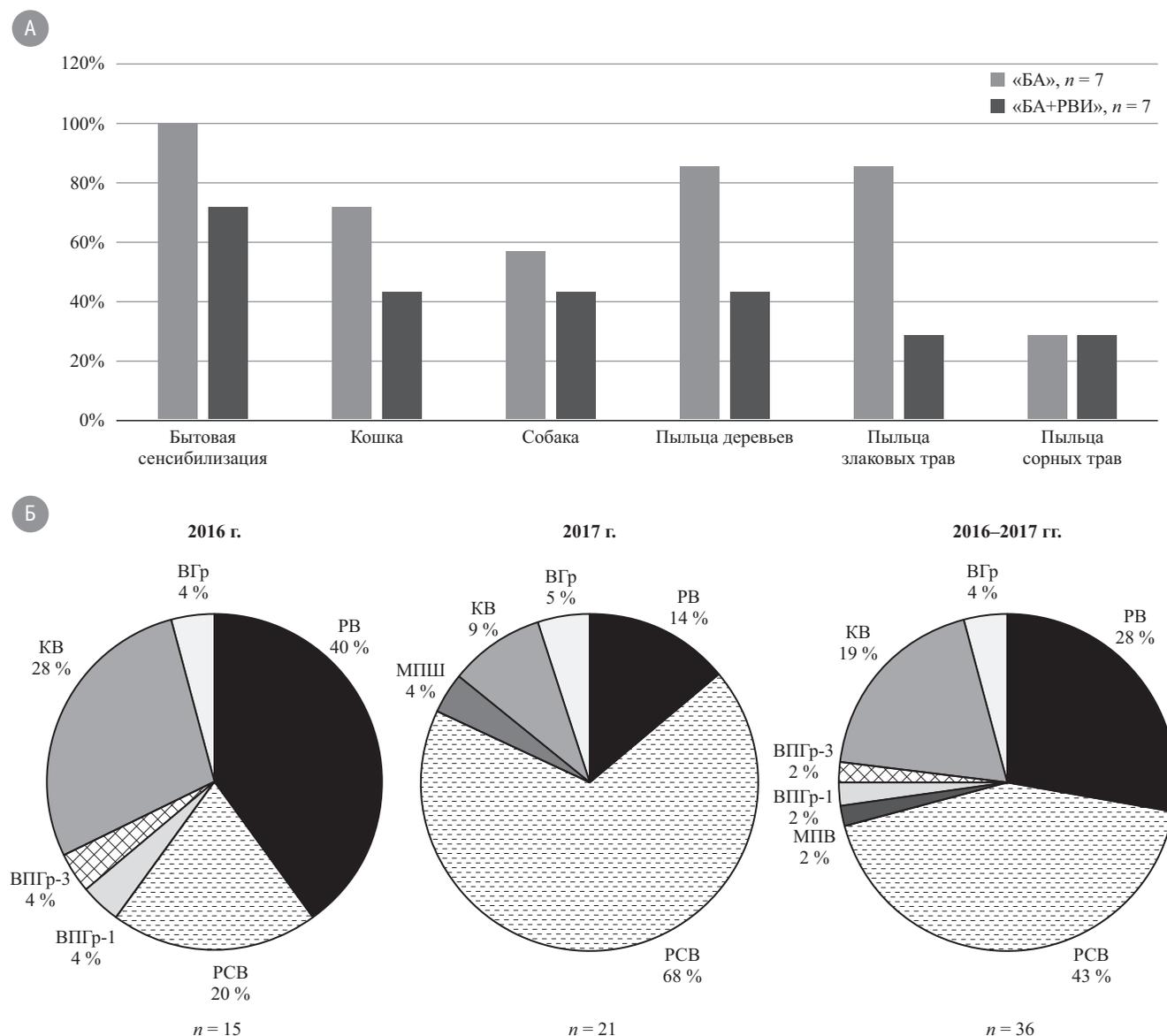


Рис. 1. Спектр сенсibilизации (А) и респираторных вирусных патогенов (Б)

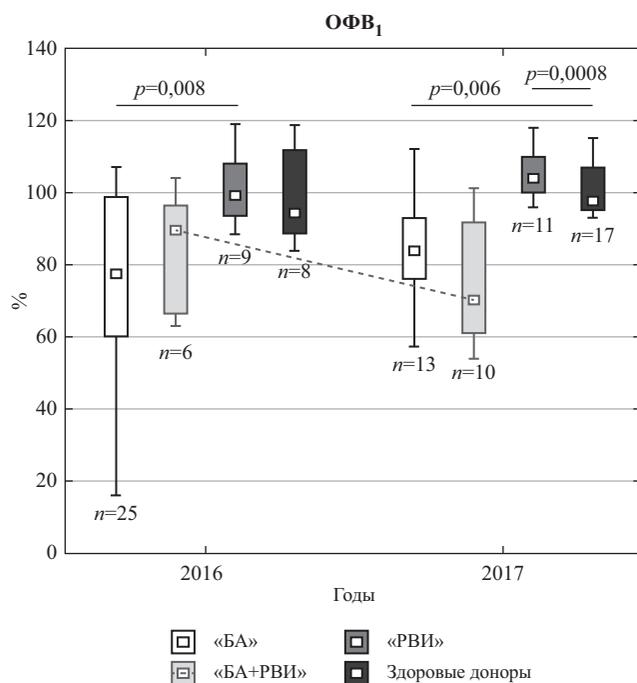


Рис. 2. Клиническая характеристика добровольцев по OFV_1

рус гриппа типа А (7,1 %). При анализе данных за 2017 г. в группе «БА+РВИ» ($n = 10$) преобладали РСВ (80 %), коронавирусы (10 %) и метапневмовирусы (10 %); а в группе «РВИ» ($n = 11$) – РСВ (58,3 %), РВ (25 %), коронавирусы (8,3 %) (см. рис. 1Б). Таким образом, в 2016 г. преобладал РВ (40 %), а в 2017 г. – РСВ (68 %) ($P = 0,0005$) (рис. 1Б).

Влияние респираторных вирусов на течение atopической БА

В рамках исследования при оценке результатов спирометрии всех добровольцев мы использовали OFV_1 как главный показатель обструктивных изменений дыхания при БА, а в качестве инструмента контроля течения БА использовали анкетирование с помощью ACQ-7 (суммарный балл меньше 1,5 при контролируемом течении БА, больше 1,5 баллов – отсутствие контроля БА) [14].

Установлено, что OFV_1 в группе «БА+РВИ» имел тенденцию к снижению при сравнении данных за 2016 и 2017 гг. (рис. 2), но статистически значимых изменений не выявлено. При этом за 2017 г. в группе «БА+РВИ» [70,5 (61,0; 92,0) %] было отмечено статистически значимое снижение по сравнению с группой «РВИ» [84,0 (76,0; 93,0) %, $P = 0,001$]. При сопоставлении данных за 2016 г. статистически значимые изменения ($P = 0,008$) были между группами «БА» [77,5 (60,0; 99,0) %] и «РВИ» [99,1 (93,4; 108,2) %] (см. рис. 2).

При анализе данных опросника ACQ-7 его общий балл (рис. 3) был значительно больше в 2017 г. в группах «БА» и «БА+РВИ» [2,43 (2,0; 2,86) и 3,2 (3,0; 4,14), соответственно] по сравнению с группой здоровых доноров ($P = 0,000004$ и $P = 0,00002$, соответственно) и группой «РВИ» ($P = 0,00004$ и $P = 0,00005$, соответственно).

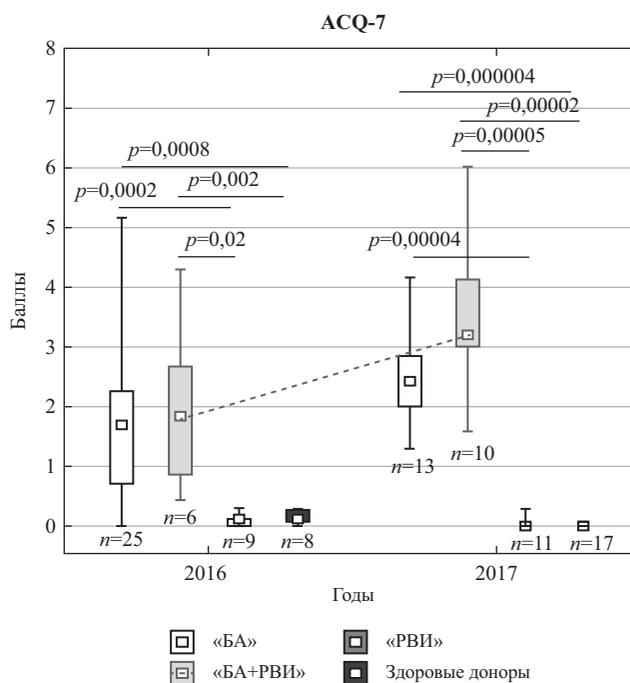


Рис. 3. Клиническая характеристика добровольцев по ACQ-7

При сравнении данных за 2016 г. также было отмечено, что ACQ-7 был больше в группе «БА» и «БА+РВИ» [1,71 (0,71; 2,29) и 1,86 (0,86; 2,71), соответственно] по сравнению с группой здоровых доноров ($P = 0,008$ и $P = 0,002$, соответственно) и группой «РВИ» ($P = 0,0002$ и $P = 0,002$, соответственно) (рис. 3).

Изменение клеточного состава периферической крови

Интерпретация лейкоцитарной формулы крови за 2016 и 2017 гг. выявила большее количество лейкоцитов в периферической крови в группе «БА+РВИ» по сравнению с остальными группами (рис. 4). Высокий уровень нейтрофилов ожидаемо определялся в группах добровольцев, страдающих atopической БА (группы «БА» и «БА+РВИ»). Моноциты были значительно выше в группе «БА+РВИ» по сравнению с группой «БА» и здоровыми донорами (см. рис. 4). Общее количество лимфоцитов в периферической крови было сопоставимым во всех группах (см. рис. 4).

Изменение экспрессии провоспалительных цитокинов

В ходе исследования за 2016 и 2017 гг. мы определяли экспрессию гена провоспалительного цитокина ИЛ-33 в МНПК, стимулированных ФГА. Было выявлено почти десятикратное повышение уровня ИЛ-33 при РВИ. Установлено увеличение уровня экспрессии мРНК *IL33* в группах «БА+РВИ» по сравнению с группой «БА» ($P = 0,003$) (рис. 5). При этом повышенная экспрессия данного цитокина не выявлена в группе «БА» по сравнению со здоровыми добровольцами (рис. 5). Эти данные свидетельствуют, что именно РВИ, а не аллергическое воспаление, способствуют активации экспрессии ИЛ-33.

Обсуждение

Данное исследование посвящено изучению влияния РВИ на течение атопической БА. В исследование включено 99 добровольцев. При детекции вирусной РНК методом ПЦР-РВ у добровольцев групп «БА+РВИ» и «РВИ» выявлено, что чаще всего встречаются РСВ (43%) и РВ (28%) как наиболее распространенные респираторные вирусы, что согласуется с данными других авторов [22, 23].

У пациентов с БА в группах «БА» и «БА+РВИ» отмечалось снижение значений $ОФВ_1$, увеличение показателя АСQ-7, повышение эозинофилии в крови. Это характеризует наличие обострения БА у добровольцев на момент включения в исследование. Различий по показателю $ОФВ_1$ групп «БА» и «БА+РВИ» не выявлено, однако в 2016 г. и в 2017 г. отмечалось значительное повышение АСQ-7 при РВИ на фоне БА. Это свидетельствует о том, что РВИ делают течение астмы менее контроли-

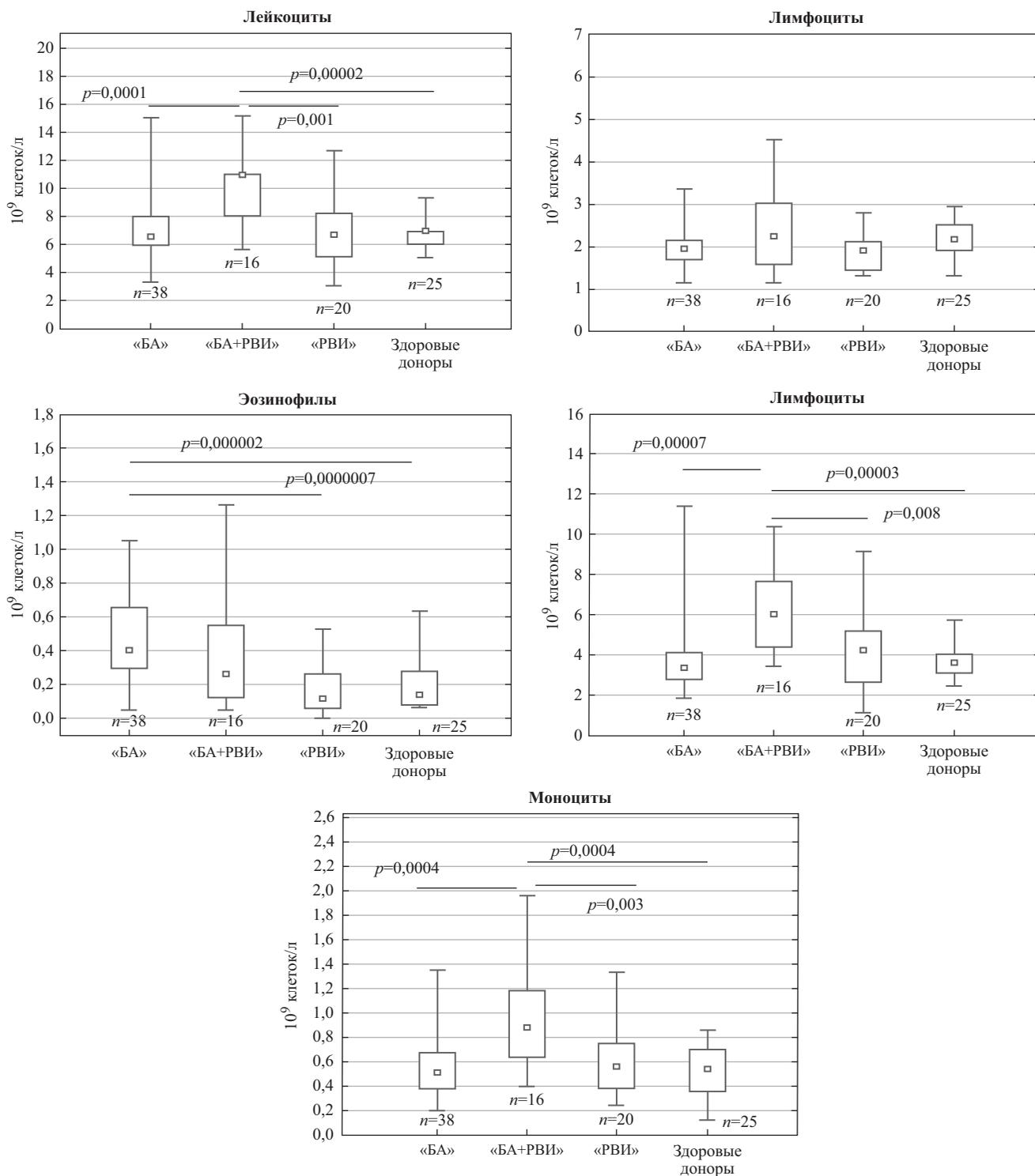


Рис. 4. Клеточный состав периферической крови добровольцев всех сравниваемых групп

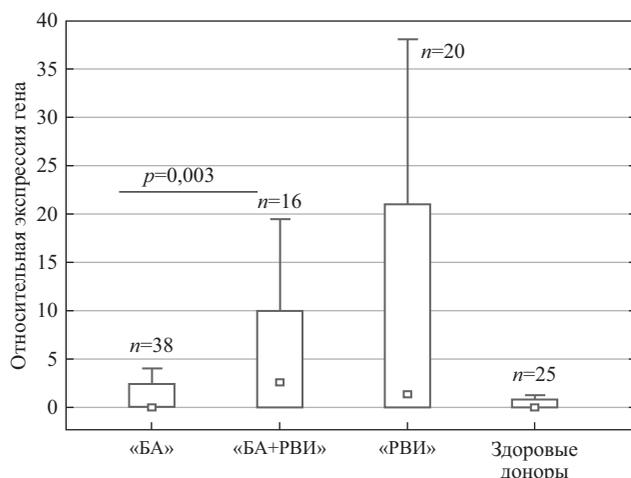


Рис. 5. Экспрессия мРНК ИЛ-33 в активированных МНПК

руемым. Стоит отметить, что в 2017 г. показатель ACQ-7 в группах «БА» и «БА+РВИ» был существенно выше, чем в 2016 г. Вероятно, это связано с тем, что в 2017 г. наиболее частым патогеном был РСВ (68 % от всех выявленных РВИ), который, по всей видимости, приводит к более тяжелому течению БА, чем РВ, который был наиболее распространен в 2016 г. (40 % от всех выявленных РВИ). Данное утверждение о более агрессивном влиянии РСВ на патогенез БА в сравнении с другими РВИ отчасти подтверждается тем фактом, что в 2017 г. значения $ОФВ_1$ были минимальными именно в группе «БА+РВИ».

В группах «БА» и «БА+РВИ» не обнаружено различий по количеству эозинофилов в крови. Это указывает, что эозинофильное воспаление доминирует вне зависимости от причинного фактора формирования обострения БА даже на фоне острого системного воспаления, вызванного респираторными вирусами.

Кроме того, повышенное количество лейкоцитов в периферической венозной крови было обнаружено в группе «БА+РВИ». Это свидетельствует о том, что острая вирусная инфекция проявляется острым инфекционным системным воспалением, которое утяжеляет течение аллергического воспаления при атопической БА, что формирует и поддерживает неконтролируемое течение и последующее обострение атопической БА.

Согласно современным данным, одним из основных факторов, запускающим вирус-индуцированные обострения БА, является провоспалительный цитокин ИЛ-33 [12]. ИЛ-33 принадлежит к семейству ИЛ-1 и ассоциируется с активацией и усилением как системного, так и локального Т2-ответа [15]. Он может способствовать развитию воспалительного процесса и прогрессированию не только БА [8], но и хронической обструктивной болезни легких [16].

Мы выявили высокую экспрессию мРНК *IL33* в МНПК при вирусной инфекции, но не при аллергическом воспалении дыхательных путей (см. рис. 5).

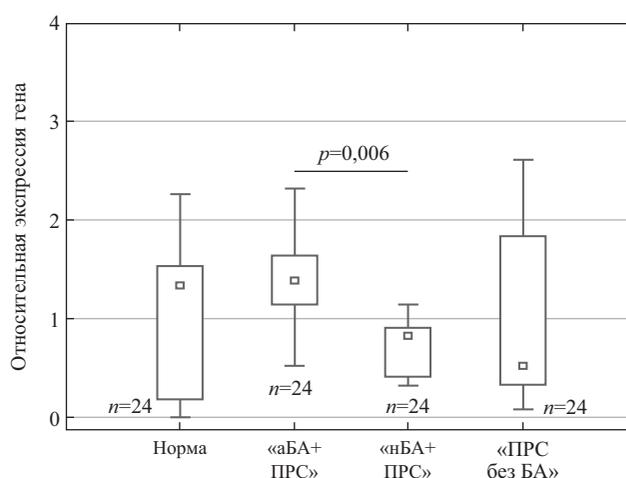


Рис. 6. Экспрессия мРНК *IL33* в полипозной ткани

БА – бронхиальная астма; аБА – атопическая БА; нБА – неаллергическая БА; ПРС – полипозный риносинусит.

Известно, что ИЛ-33 в основном продуцируется в эпителиальных клетках, но он может экспрессироваться и многими другими типами клеток, включая дендритные клетки, макрофаги, моноциты, тучные клетки и др. [17]. Мы выявили значительное увеличение экспрессии ИЛ-33 в стимулированных МНПК. Мы считаем, что в популяции МНПК продуцентами ИЛ-33 могли выступать моноциты, что повреждается работами других авторов [18]. Отчасти, это подтверждается тем фактом, что количество моноцитов значительно увеличивалось в группе «БА+РВИ». Таким образом, полученные нами данные подтверждают роль ИЛ-33 как фактора, запускающего вирус-индуцированные обострения БА.

В проведенных нами ранее исследованиях на лабораторных мышах были получены сходные результаты. В частности, мы выявляли значительное увеличение экспрессии ИЛ-33 в легких при индукции у мышей атопической БА на фоне респираторной вирусной инфекции [19].

В другом нашем исследовании изучались механизмы влияния полипозного риносинусита (ПРС) на течение БА. Нами было выявлено более тяжелое и неконтролируемое течение БА в сочетании с ПРС по сравнению с группой «ПРС без БА». В этом исследовании мы также определяли уровень экспрессии ИЛ-33 и обнаружили его статистически значимое повышение ($P = 0,006$) у пациентов с атопической БА в сочетании с ПРС по сравнению с группой «неаллергическая БА в сочетании с ПРС». Повышение экспрессии ИЛ-33 способствовало усилению воспаления, тем самым усугубляло течение и БА, и ПРС [20] (рис. 6). Полученные результаты не только подтвердили этот факт, но и показали, что при сочетании атопической БА с ПРС и/или РВИ уровень провоспалительного цитокина ИЛ-33 повышается в большой степени, т.е. ИЛ-33 участвует в развитии/усугублении воспаления, приводящего к утяжелению симптомов БА и уменьшению эффективности ее стандартной терапии.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают решающую роль ИЛ-33 в развитии воспалительного ответа при вирусной инфекции у человека и при вирус-индуцированном обострении БА. В частности, ИЛ-33 может стимулировать аллергическое воспаление путем селективной активации эффекторных клеток – базофилов и эозинофилов [21, 22].

Заключение

Результаты исследования представляют дополнительные доказательства роли провоспалительного ИЛ-33 в патогенезе вирус-индуцированных обострений атопической БА (чаще всего патогенами РСВ и РВ). На основании полученных нами данных можно акцентировать внимание на триггерном воздействии респираторных вирусов на течение и прогноз БА. Выявление новых механизмов формирования вирус-индуцированных обострений атопической БА может быть использовано при подборе и разработке персонализированной

базисной противоастматической терапии, в частности для пациентов, страдающих атопической БА с частыми вирус-индуцированными обострениями. Полученные данные о роли провоспалительного ИЛ-33 в развитии каскада иммунных реакций при РВИ и при вирус-индуцированном обострении атопической БА могут быть использованы для разработки новых молекул (моноклональные антитела против ИЛ-33), предназначенных для подавления персистирующего системного и локального воспаления при атопической БА и профилактики ее обострений, вызванных респираторными вирусами.

ИЛ-33 может стать потенциальной мишенью для противоастматической таргетной терапии, которая повысит эффективность стандартной базисной терапии, а следовательно, качество жизни пациентов с атопической БА значительно улучшится и не будет зависеть от частых эпидемий и пандемий РВИ, эпизодов стационарного лечения и потери трудоспособности по поводу обострений БА.

Литература

- Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2016 update). GINA. 2016. URL: www.ginasthma.org. (дата обращения: 14.04.2017)
- Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению бронхиальной астмы. 2016. URL: www.pulmonology.ru. (дата обращения: 06.09.2017)
- Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 2012 (IV издание).
- Heffler E., Bagnasco D., Canonica G.W. Strategies to reduce corticosteroid-related adverse events in asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol* 2019; 19 (1): 61–7.
- Галицкая М.А., Курбачёва О.М. Современные представления о роли врожденного и приобретенного иммунитета при бронхиальной астме. *Российский аллергологический журнал*. 2018; 6: 7–17.
- Shilovskiy I.P., Eroshkina D.V., Babakhin A.A., Khaitov M.R. Anticytokine therapy of allergic asthma. *Mol. Biol.* 2017; 51 (1): 1825–48.
- Salter B.M., Oliveria J.P., Nusca G., Smith S.G. et al. IL-25 and IL-33 induce Type 2 inflammation in basophils from subjects with allergic asthma. *Respir. Res.* 2016; 17: 5.
- Prefontaine D., Nadigel J., Chouiali F., Audusseau S. et al. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125 (3): 752–4.
- Liu X., Hammel M., He Y.F., Tainer J.A. et al. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110 (37): 14 918–23.
- Багаутдинова Э.Г., Каримов Д.О., Мухаммадиева Г.Ф., Шаталина А.У., Бакиров А.Б. Роль полиморфного локуса rs3939286 гена IL33 в развитии аллергического ринита у работников агропромышленных производств. *Иммунология*. 2016; 37 (2): 76–8.
- Khaitov M.R., Gaisina A.R., Shilovskiy I.P., Smirnov V.V. et al. The role of interleukin-33 in pathogenesis of bronchial asthma. *New experimental data. Biochemistry (Moscow)*. 2018; 83 (1): 13–25.
- Jackson D.J., Gangnon R.E., Evans M.D., Roberg K.A. et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 178 (7): 667–72.
- Jackson D.J., Johnston S.L. The role of viruses in acute exacerbations of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125 (6): 1178–87.
- Plaza V., Ramos-Barbón D., Muñoz A.M., Fortuna A.M. et al. Exhaled nitric oxide fraction as an add-on to ACQ-7 for not well controlled asthma detection. *PLoS One.* 2013; 25 (10): e77085.
- Makrinioti H., Toussaint M., Jackson D.J., Walton R.P. et al. Role of interleukin 33 in respiratory allergy and asthma. *Lancet Respir. Med* 2014; 2 (3): 226–37.
- Xia J., Zhao J.L., Shang J., Li M. et al. Increased IL-33 expression in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2015; 308 (7): L619–27.
- Furukawa S., Moriyama M., Miyake K., Nakashima H. et al. Interleukin-33 produced by M2 macrophages and other immune cells contributes to Th2 immune reaction of IgG4-related disease. *Sci. Rep* 2017; 7 (42413): 1–10.
- Nile C.J., Barksby E., Jitprasertwong P., Preshaw P.M. et al. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology.* 2010; 130 (2): 172–80.
- Khaitov M.R., Shilovskiy I.P., Nikonova A.A., Shershakova N.N. et al. Small interfering RNAs targeted to interleukin-4 and respiratory syncytial virus reduce airway inflammation in a mouse model of virus-induced asthma exacerbation. *Hum. Gene Ther.* 2014; 25 (7): 642–50.
- Pecaric-Petkovic T., Didichenko S.A., Kaempfer S., Spiegl N. et al. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 2009; 113 (7): 1526–34.
- Galitskaya M.A., Shilovskiy I.P., Nikonova A.A., Gaisina A.R. et al. Increased il-33 expression in atopic bronchial asthma patients with confirmed viral respiratory infection. *Allergy.* 2018; 73 (105): 298.
- Newcomb D.C., Peebles R.S. Jr. Bugs and asthma: a different disease? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2009; 6 (3): 266–71.
- Dyneva M., Kurbacheva O., Shilovskiy I., Kovchina V. et al. Analysis of the expression of Th-1, Th-2, Th-17 cytokines in patients with allergic and non-allergic bronchial asthma associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy.* 2019; 74 (106): PD0361.

References

- Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2016 update). GINA. 2016. URL: www.ginasthma.org. (date of access April 14, 2017)
- Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of bronchial asthma. 2016. URL: www.pulmonology.ru. (date of access September 6, 2017) (in Russian)
- National program «Bronchial asthma in children. Treatment Strategy and Prevention». 2012 (IV edition) (in Russian)
- Heffler E., Bagnasco D., Canonica G.W. Strategies to reduce corticosteroid-related adverse events in asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol* 2019; 19 (1): 61–7.

5. Galitskaya M.A., Kurbacheva O.M. The modern ideas about the role of innate and adaptive immunity in bronchial asthma. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal*. 2018; 6: 7–17 (in Russian)
6. Shilovskiy I.P., Eroshkina D.V., Babakhin A.A., Khaitov M.R. Anticytokine therapy of allergic asthma. *Mol. Biol.* 2017; 51 (1): 1825–48.
7. Salter B.M., Oliveria J.P., Nusca G., Smith S.G., et al. IL-25 and IL-33 induce Type 2 inflammation in basophils from subjects with allergic asthma. *Respir. Res.* 2016; 17: 5.
8. Prefontaine D., Nadigel J., Chouiali F., Audusseau S., et al. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125 (3): 752–4.
9. Liu X., Hammel M., He Y.F., Tainer J.A., et al. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110 (37): 14 918–23.
10. Bagautdinova G.E., Karimov D.O., Mukhammadiyeva G.F., Shagalina A.U., Bakirov A.B. Role of the polymorphic locus rs3939286 IL33 gene in the development of allergic rhinitis in workers allelopathic productions. *Immunologiya*. 2016; 37 (2): 76–8. (in Russian)
11. Khaitov M.R., Gaisina A.R., Shilovskiy I.P., Smirnov V.V., et al. The role of interleukin-33 in pathogenesis of bronchial asthma. New experimental data. *Biochemistry (Moscow)*. 2018; 83 (1): 13–25.
12. Jackson D.J., Gangnon R.E., Evans M.D., Roberg K.A., et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 178 (7): 667–72.
13. Jackson D.J., Johnston S.L. The role of viruses in acute exacerbations of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125 (6): 1178–87.
14. Plaza V., Ramos-Barbón D., Muñoz A.M., Fortuna A.M., et al. Exhaled nitric oxide fraction as an add-on to ACQ-7 for not well controlled asthma detection. *PLoS One*. 2013; 25 (10): e77085.
15. Makrinioti H., Toussaint M., Jackson D.J., Walton R.P., et al. Role of interleukin 33 in respiratory allergy and asthma. *Lancet Respir. Med* 2014; 2 (3): 226–37.
16. Xia J., Zhao J.L., Shang J., Li M., et al. Increased IL-33 expression in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2015; 308 (7): L619–27.
17. Furukawa S., Moriyama M., Miyake K., Nakashima H., et al. Interleukin-33 produced by M2 macrophages and other immune cells contributes to Th2 immune reaction of IgG4-related disease. *Sci. Rep* 2017; 7 (42413): 1–10.
18. Nile C.J., Barksby E., Jitprasertwong P., Preshaw P.M., et al. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology*. 2010; 130 (2): 172–80.
19. Khaitov M.R., Shilovskiy I.P., Nikonova A.A., Shershakova N.N., et al. Small interfering RNAs targeted to interleukin-4 and respiratory syncytial virus reduce airway inflammation in a mouse model of virus-induced asthma exacerbation. *Hum. Gene Ther.* 2014; 25 (7): 642–50.
20. Pecaric-Petkovic T., Didichenko S.A., Kaempfer S., Spiegl N., et al. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 2009; 113 (7): 1526–34.
21. Galitskaya M.A., Shilovskiy I.P., Nikonova A.A., Gaisina A.R., et al. Increased il-33 expression in atopic bronchial asthma patients with confirmed viral respiratory infection. *Allergy*. 2018; 73 (105): 298.
22. Newcomb D.C., Peebles R.S. Jr. Bugs and asthma: a different disease? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2009; 6 (3): 266–71.
23. Dyneva M., Kurbacheva O., Shilovskiy I., Kovchina V., et al. Analysis of the expression of Th-1, Th-2, Th-17 cytokines in patients with allergic and non- allergic bronchial asthma associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy*. 2019; 74 (106): PD0361.

Вопросы преподавания

© Ганковская Л.В., 2020

Ганковская Л.В.

С иммунологией навсегда!

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

Gankovskaya L.V.

With immunology forever!

Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU) of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

*Ученый не тот, кто дает правильные ответы,
а тот, кто ставит правильные задачи.
Клод Леви-Стросс*

22 марта 2020 г. международное научное сообщество поздравляет академика Р.В. Петрова со славным Юбилеем!

Академик РАН Рэм Викторович Петров – один из основоположников отечественной школы иммунологов, известный специалист в области фундаментальной и клинической иммунологии.

С именем Р.В. Петрова связано решение многих фундаментальных и прикладных проблем современной иммунологии, таких как радиационная иммунология, генетический контроль иммунного ответа, молекулярные механизмы иммунорегуляции и клеточных взаимодействий, создание принципиально новых иммуностропных лекарственных препаратов, концепции и методологии оценки иммунного статуса, разработка принципов конструирования вакцин нового поколения с повышенными иммунизирующими свойствами.

Р.В. Петров определил основные этапы становления преподавания иммунологии как самостоятельной дисциплины в нашей стране (фото 1).

Первый опыт преподавания общей (неинфекционной) иммунологии Р.В. Петров получил в Новосибирском государственном университете, прочитав студентам в 1965 г. цикл лекций, которые легли в основу фактически первого учебника «Введение в инфекционную иммунологию». В то же время зародилась идея обучения иммунологии будущих врачей.

Время шло, иммунология выдвинулась в ранг наук, способных дать ключ к решению многих кардинальных проблем современной медицины. В конце 1960-х – начале 1970-х гг. возникли предпосылки внедрения фундаментальных разработок в практическую медицину. Объединяющим началом стало сформировавшееся к тому времени учение об иммунодефицитах человека. Важнейшая роль отводилась центральному органу иммунной системы – тимусу. В тот период в 2-м МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова под руководством ректора академика Ю.М. Лопухина проводились первые попытки

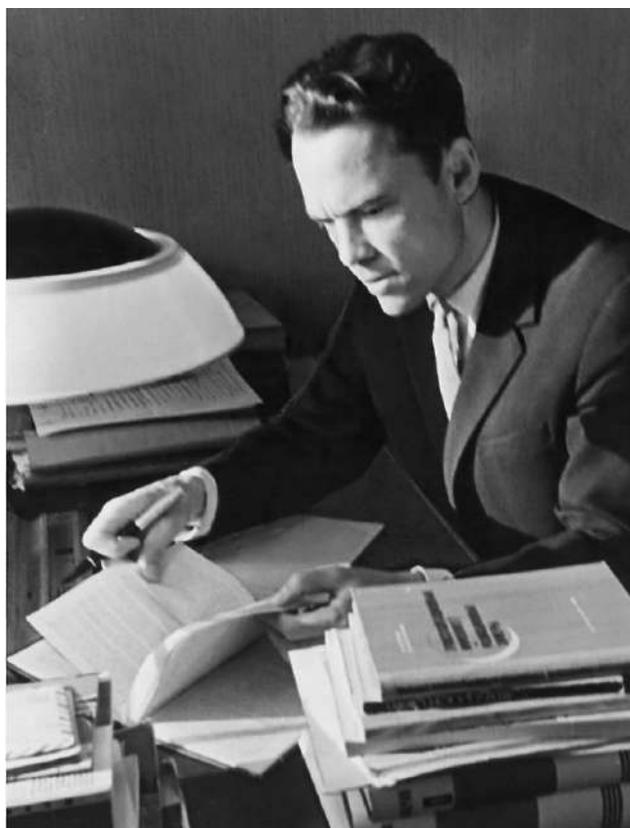


Фото 1. С именем Р.В. Петрова связано начало преподавания иммунологии в нашей стране

лечения детей с тяжелой формой иммунодефицита – атаксией-телеангиэктазией. Ю.И. Морозовым была разработана уникальная операция пересадки тимуса в комплексе с грудиной, которая дала положительный эффект.

Именно проблема иммунодефицитов послужила началом научного контакта между хирургами и иммунологами. В историю эта ситуация вошла как «встреча у тимуса», которая состоялась между ректором 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова академиком Ю.М. Лопухиным и Р.В. Петровым в 1969 г. на конгрессе трансплан-



Фото 2. У истоков создания кафедры иммунологии стояли талантливые ученые и выдающиеся организаторы профессор Р.В. Петров и ректор 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова академик РАМН Ю.М. Лопухин

тологов в Париже. Эта встреча дала начало не только развитию нового направления иммунологии в стране, но и позволила решить вопрос о создании первой кафедры иммунологии (фото 2). Уже в 1970 г. Рэм Викторович читает лекции студентам VI курса медико-биологического факультета, а затем создает курс неинфекционной иммунологии с основами иммуногенетики. Лекции Р.В. Петрова по новой иммунологии вызвали огромный интерес и всегда проходили при полной аудитории. Отличающиеся высокой информативностью и доходчивым изложением, они стали фундаментальной основой для многих иммунологов (фото 3).



Фото 4. Первые сотрудники кафедры иммунологии: Р.В. Петров, Е.В. Соколова, Л.В. Ковальчук и заведующий отделом клинической иммунологии А.Н. Чередеев



Фото 3. Чтение лекций студентам VI курса медико-биологического факультета 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова, ГКБ № 55 (1978)

Наконец в 1974 г. Рэм Викторович создал самостоятельную кафедру иммунологии, которую и возглавлял в течение 20 лет. В 1982 г. он издает первый учебник иммунологии, по которому обучалось не одно поколение специалистов. Под руководством академика Р.В. Петрова обоснован новый принцип преподавания иммунологии в два этапа в рамках одной кафедры: общая иммунология и клиническая иммунология с аллергологией. По такому принципу преподавание теперь ведется во многих медицинских вузах страны и в ряде зарубежных стран. С первых дней на кафедре работал Л.В. Ковальчук, воспитавший не одно поколение имму-



Фото 5. Всесоюзная школа иммунологов Москва, ЦНИЛ (1981)



Фото 6. Р.В. Петров

нологов. Именно ему спустя 20 лет Рэм Викторович доверил руководство кафедрой. Бессменным заведующим учебной частью в течение 40 лет была Е.В. Соколова, которая работает на кафедре и по сей день (фото 4).

Интерес к иммунологии в научном сообществе возрастал, и уже спустя 3 года после создания на кафедре обучались 11 аспирантов, среди них были аспиранты из Украины, Прибалтики и ГДР. Рэм Викторович умел задать правильные вопросы и определить вектор научных исследований, что для молодых аспирантов было крайне важно. Под его руководством защитили диссертации более 80 докторов и кандидатов наук. Преобладающее большинство врачей СССР, СНГ, России, работающих в области клинической иммунологии, прошли стажировку в отделе и на кафедре иммунологии 2-го Московского медицинского института им. Н.И. Пирогова.

Важнейшими этапами развития иммунологии как дисциплины были также создание и организация многочисленных школ по клинической иммунологии (фото 5). В 1980-е гг. был сформулирован двухэтапный принцип оценки иммунной системы, в 1983 г. были опубликованы методические рекомендации Минздрава СССР.

Р.В. Петров активно разрабатывал рабочие программы для преподавания иммунологии. При его непосредственном участии был подготовлен приказ Минздрава РСФСР «Об организации кафедр иммунологии с аллергологией в медицинских вузах» (1986). Началась работа по организации преподавания иммунологии в медицинских вузах страны. Были подготовлены

курсы лекций, методических пособий по иммунологии для студентов медицинских вузов, клинических ординаторов, аспирантов.

Многие ученики Р.В. Петрова возглавили клинические кафедры иммунологии, стали организаторами иммунологической службы в регионах. В дальнейшем Р.В. Петров участвовал в разработке новой специальности – врач аллерголог-иммунолог, которая в 1995 г. была внесена в номенклатуру врачебных и провизорских специальностей, в 1999 г. – закреплена как основная специальность приказом Минздрава России.

Кафедра иммунологии МБФ развивалась, и со временем было организовано преподавание иммунологии для студентов и ординаторов на клинических базах: в ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России», отделении клинической иммунологии Российской детской клинической больницы и отделении аллергологии ЦКБ РАН.

В настоящее время преподавание дисциплины «Иммунология» проводится на медико-биологическом, лечебном, педиатрическом, стоматологическом, международном факультетах РНИМУ им. Н.И. Пирогова. В течение учебного года на кафедре иммунологии обучаются более 2000 студентов. Современный врач лечебной практики и педиатр должны уметь ориентироваться в наиболее актуальных проблемах клинической иммунологии и аллергологии: иммунопатогенезе различных заболеваний, диагностике, таргетной иммунотерапии.

Высококвалифицированные преподаватели кафедры (11 профессоров, 12 доцентов и 8 ассистентов) с полной самоотдачей читают лекции и проводят занятия, интегрируют науку в образовательный процесс. На кафедре создан центр персонализированной медицины, оснащенный современным оборудованием, где исследуются молекулярно-генетические механизмы врожденного иммунитета в патогенезе социально значимых заболеваний человека. Создание центра позволило привлечь сотрудников клинических кафедр университета к фундаментальным исследованиям.

Заложив основы отечественной иммунологии не только как науки, но и как учебной дисциплины, Рэм Викторович вдохновил и продолжает вдохновлять многие поколения ученых-иммунологов, искренне увлеченных своей специальностью.

Коллектив кафедры иммунологии, его ученики от всей души поздравляют Рэма Викторовича с юбилеем и желают ему здоровья, долгих лет, дальнейших творческих успехов на благо отечественной иммунологии!

Обзоры

© А.В. Полевщиков, П.Г. Назаров, 2020

Полевщиков А.В., Назаров П.Г.

Иммунология белков острой фазы воспаления и работы Р.В. Петрова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Резюме

В статье приведен обзор литературы и достижений авторов за 25 лет в области изучения белков острой фазы воспаления семейства пентраксинов – С-реактивного белка (CRP) и сывороточного амилоида Р (SAP). Авторы посвящают обзор академику Рэму Викторовичу Петрову, пионеру изучения иммунологии воспаления в России, в честь его 90-летнего юбилея.

Ключевые слова: пентраксины; С-реактивный белок; сывороточный амилоид Р; острая фаза воспаления

Статья поступила 02.02.2020. Принята в печать 20.02.2020.

Для цитирования: Полевщиков А.В., Назаров П.Г. Иммунология белков острой фазы воспаления и работы Р.В. Петрова. Иммунология. 2020; 41 (2): 167–173. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-167-173

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Polevshchikov A.V., Nazarov P.G.

Immunology of acute phase proteins of inflammation and work of R.V. Petrov

Institute of Experimental Medicine, Ministry of High Education and Science of the Russian Federation, 197376, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract

A review of the literature and achievements of the authors over 25 years in the study of acute phase inflammation proteins of the pentraxin family – C-reactive protein (CRP) and serum amyloid P component (SAP). The authors dedicate the review to Academician R.V. Petrov, a pioneer of immunology of inflammation research in Russia in honor of his 90th anniversary.

Keywords: pentraxins; C-reactive protein; serum amyloid P component; acute phase of inflammation

Received 02.02.2020. Accepted 20.02.2020.

For citation: Polevshchikov A.V., Nazarov P.G. Immunology of acute phase proteins of inflammation and work of R.V. Petrov. Immunologiya. 2020; 41 (2): 167–73. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-167-173 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

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

For correspondence
Alexander V. Polevshchikov –
Dr.Sci. (Biological Sciences),
Professor, Head of the Department
of Immunology,
Institute of Experimental Medicine,
St. Petersburg,
Russian Federation
E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3342-178X>

Введение

Символично, что год рождения академика Р.В. Петрова совпадает с открытием в 1930 г. В. Тиллетом и Т. Френсисом С-реактивного белка (C-reactive protein, CRP), которое положило начало изучению всех белков острой фазы воспаления и – шире – планомерным исследованиям иммунологии воспаления, механизмов кооперации факторов врожденного и приобретенного

иммунитета, оценке роли иммунологических и биохимических сдвигов в патогенезе широкого круга заболеваний [1].

Масштабные исследования CRP начались в Советском Союзе и во всем мире в середине 1950-х гг. [2, 3] и привели к накоплению массива клинических данных о появлении CRP в сыворотке крови при воспалительных процессах и бактериальных инфекциях различного

генеза [4, 5], что создало возможность использования оценки уровня CRP для характеристики тканевого поражения и дифференциальной диагностики бактериальных и вирусных инфекций [6]. Изучение механизмов острого и хронического воспаления, универсальность CRP как интегративного показателя воспаления, его важное клиническое значение стали, по-видимому, теми причинами, которые привели к появлению превосходного обзора Р.В. Петрова, посвященного анализу клинического значения CRP [7] – фактически первой работы на русском языке, посвященной этому белку и не потерявшей своего значения и актуальности до настоящего времени. Высказанные в обзоре идеи получили свое дальнейшее развитие в более поздних публикациях Р.В. Петрова [8], а также в его совместных трудах с многочисленными учениками, где были сформулированы принципы оценки иммунного статуса человека, в которых оценка уровня CRP стала неотъемлемым компонентом тестов I уровня [9, 10].

Все это заставляет еще раз вернуться к анализу проблем иммунологии белков острой фазы воспаления [на примере CRP и его близкого гомолога – сывороточного амилоидного Р-компонента (serum amyloid P component, SAP)], применительно к фундаментальной науке и современной клинической практике.

Молекулы CRP и SAP

Белки CRP и SAP стали первыми охарактеризованными членами семейства пентраксинов – молекул с циклической пентамерной структурой, кальций-зависимым связыванием лиганда и гомологией аминокислотных последовательностей. Эти белки активируют комплемент по классическому пути и участвуют в опсонизации корпускулярных антигенов и бактерий, взаимодействуют с антигенами ядер клеток, в частности с хроматином и малыми ядерными рибонуклеопротеинами (snRNP), проникая в ядра клеток через пути внутриклеточного транспорта. Маркерным лигандом семейства считается фосфорилхолин, входящий в состав многих фосфолипидов. Структурно сходный с фосфорилхолином нейромедиатор ацетилхолин также связывается и нейтрализуется CRP [11], поэтому при введении экспериментальным животным CRP ведет себя как холинолитик острой фазы, оказывая существенное влияние на развитие анафилактического шока у морских свинок [12]. Пентраксины влияют на клиренс ядерных антигенов *in vivo*. Считается, что одной из основных биологических функций этих белков как раз и является взаимодействие с ядерными антигенами апоптотических и некротизированных клеток. Пентраксины могут препятствовать накоплению и отложению этих антигенов в тканях и индукции аутоиммунных реакций [13]. CRP и SAP регулируются у разных видов по-разному. У человека CRP – мажорный острофазовый реактант, уровень которого в острой фазе ответа повышается в сотни раз (от 5 до 3000 мкг/мл) и выше. У мыши мажорным реактантом является другой пентраксин – SAP, тогда как CRP экспрессируется

на очень низком уровне (< 5 мкг/мл). У лабораторных мышей базальный уровень SAP зависит от генетической линии животных. У человека SAP экспрессирован конститутивно на уровне около 30–50 мкг/мл и возрастает всего в 2–5 раз лишь при хронизации воспаления [14].

Гораздо позднее в дополнение к CRP и SAP, а также белку самок хомячков HFP описаны новые члены семейства, в том числе белок моноцитов и макрофагов человека TSG-14 (он же пентраксин-3, PTX3) [15], нейрональные пентраксины человека NPX1 и NPX2 [16, 17], а также апексин – внутриклеточный белок акросомы сперматозоидов морской свинки [18, 19].

Молекулярно-генетическая характеристика и регуляция синтеза CRP и SAP

Гены *CRP* и *SAP* человека расположены на хромосоме 1 (1q2.1). Под одним промотором лежат (в направлении от центромеры к теломере) ген *CRP*, его псевдоген и ген *SAP* [20]. Концентрация CRP в плазме значительно возрастает во время острофазового ответа на повреждение ткани или воспаление. Изменению уровня реактантов острой фазы предшествует повышение уровня циркулирующих цитокинов. У человека основным индуктором гена *CRP in vitro* является интерлейкин (ИЛ)-6, а ИЛ-1 и стероиды усиливают эффект ИЛ-6 [21]. ИЛ-1 может быть заменен фактором некроза опухолей (ФНО) α , который влияет на ген таким же образом, а ИЛ-6 – другими цитокинами, входящими в одно семейство с ИЛ-6 (ИЛ-11, LIF, онкостатином М) [22].

Регуляция синтеза CRP осуществляется как на уровне трансляции, так и на посттрансляционном уровне. ИЛ-1 β сам по себе незначительно изменял уровень транскрипции гена *CRP*, но в комбинации с ИЛ-6 проявлялся существенный аддитивный эффект [23]. В состав промотора гена *CRP* человека входят два элемента острофазового ответа (*APRE*). *APRE1* содержит сайт связывания гепатоспецифического транскрипционного фактора HNF-1. В пределах *APRE2* лежат сайты связывания как для HNF-1 (β -сайт), так и для NF-IL-6 (C/EBP β , α -сайт) [24]. NF-IL-6 недавно был определен как транскрипционный фактор, индуцируемый ИЛ-6 и активирующий зависимое от протеинкиназы С фосфорилирование в позиции Ser105. В свою очередь в пределах NF-IL-6 (C/EBP β) также был установлен участок STAT3, который связывается со специфическими элементами в промоторных участках генов, отвечающих на ИЛ-6. Эти промоторы обычно содержат палиндромную последовательность нуклеотидов TT(N)5AA и расположены с самого края 5'-фланкирующего участка [25]. Иными словами, ИЛ-6 активирует белок STAT3, который взаимодействует с α -сайтом NF-IL-6 и усиливает связывание HNF-1 с β -сайтом, что приводит к кооперативному эффекту в ходе гепатоспецифической индукции CRP [20].

ИЛ-6 также индуцирует синтез иРНК сывороточного амилоида Р человека. Однако, в отличие от CRP, обработка ИЛ-1 β не только не повышает уровня синтеза

SAP, но и снижает его как в интактных, так и в стимулированных ИЛ-6 клетках [20]. Аналогичную роль в случае CRP играл ФНО α , который отменял синтез CRP, индуцированный ИЛ-6, ИЛ-1 или их комбинацией [26]. В гене *Sap* мыши картированы *cis*-доминантные элементы промотора [27]. Однако для мыши SAP является главным острофазовым белком и результаты вряд ли могут быть полностью перенесены на человека. Во всяком случае на это указывает как неоднозначная роль отвечающих на ИЛ-6 промоторов, *cis*-доминантных последовательностей и ИЛ-1-зависимых ДНК-связывающих белков, так и характер трансляции гена *SAP* человека в трансгенных мышах [28].

Оценка роли ИЛ-6 в индукции синтеза CRP и SAP внезапно приобрела высокую актуальность в связи с пандемией COVID-19. В ходе вызванного данным вирусом инфекционного процесса именно драматическое повышение уровня ИЛ-6 в крови стало важной характеристикой заболевания, поскольку этим цитокином опосредованы процессы необратимой альтерации тканей [29].

Источники и цитотропные эффекты CRP и SAP

Гепатоциты являются основным местом синтеза как CRP, так и SAP, что было показано еще в 1960-е гг. [30]. Помимо гепатоцитов, способностью к синтезу CRP обладают моноциты/макрофаги [31] и лимфоциты [32, 33]. Некоторые исследователи связывают способность к синтезу CRP только с популяцией НК-клеток [34]. Сведения о возможности внепеченочного синтеза SAP отсутствуют.

Цитотропные эффекты CRP и SAP описаны во множестве работ. В качестве опсонина CRP взаимодействует со всеми фагоцитами, но модуляция активности всех лейкоцитов и клеток рыхлой соединительной ткани описана для обоих пентраксинов [35–37]. Тем не менее, решение некоторых очевидных вопросов до настоящего времени не выглядит однозначным. Так, многолетняя дискуссия о природе рецепторов, через которые развиваются все цитотропные эффекты CRP, указала на роль Fc γ -рецепторов как главного пути связывания CRP с клетками [38]. Связываясь с Fc γ -рецепторами, CRP активирует базофилы и тучные клетки, вызывает их дегрануляцию и выброс вазоактивного медиатора гистамина [39–41]. Активируя тучные клетки, CRP влияет на их взаимодействие с фибробластами, что может указывать на профибротическую активность пентраксина при хронических воспалительных процессах [42]. Через Fc γ -рецепторы CRP влияет также на эндотелиальные клетки, усиливая трансэндотелиальный транспорт апоВ-содержащих липопротеинов низкой плотности, что по-новому освещает проатерогенную роль этого острофазового белка в патогенезе атеросклероза [43]. Однако, принимая во внимание роль CRP и SAP, выступающих как акцепторы (лиганды) патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) и паттернов, ассоциированных с тканевым повреждением (DAMP), не исключается также и возможность связывания этих белков с фагоцитами и через другие мембранные рецепторы [44].

CRP и SAP при различных патологических состояниях

Литературные данные по этому вопросу могут составить предмет самостоятельного обзора, поэтому представляется целесообразным ограничиться кратким анализом основных достижений и направлений исследований, имеющих непосредственное отношение к анализу функций CRP. Именно эту цель преследовал академик Р.В. Петров, публикуя свой обзор [7]. Время показало значение этих ставших классическими данных в настоящее время, когда уровень CRP уже является очень простым и надежным прогностическим критерием в оценке течения COVID-19 [45].

Повышение уровня CRP в сыворотке крови начинается через 3–6 ч после изменения гомеостаза, и его уровень удваивается каждые 8 ч. Факторами, вызывающими синтез CRP, могут быть бактериальные и некоторые вирусные инфекции, паразитарные инвазии и микозы, ушибы, переломы и ожоги, аутоиммунные заболевания, опухолевый рост, отторжения трансплантатов, радиационные поражения, инфаркты органов и тканей, срочные и досрочные роды, а также напряженная мышечная работа и хирургические вмешательства [6, 7, 47]. Уровень CRP достигает максимума на 2–3-й день воспалительной реакции и при неосложненном течении процесса, а в отсутствие хронизации постепенно возвращается к исходному уровню на 12–15-й день после воздействия, вызвавшего острофазовую реакцию [48]. В целом динамика CRP сходна с динамикой другого острофазового белка – сывороточного амилоида А и, что особенно важно в настоящее время, с показателем СОЭ и общим уровнем провоспалительных цитокинов [49, 50].

Частота проявления CRP при различных патологиях представлена в таблице. Востребованность оценки уровня CRP в настоящее время значительно возросла, поскольку его уровень отражает не только уровень провоспалительных цитокинов, но и масштаб альтерации тканей, что позволяет рассматривать оценку уровня CRP как удобный и простой способ дифференцирования традиционных вирусных респираторных инфекций (ОРВИ, грипп) от COVID-19. Кроме того, CRP обнаруживается в ликворе и используется для дифференциальной диагностики бактериальных и вирусных менингитов. Повышенные уровни CRP описаны также при тонзиллитах и средних отитах бактериальной природы, при инфекциях мочевыводящих путей и циститах, аппендицитах и панкреатитах.

Уровень SAP, напротив, остается у человека весьма стабильным в ходе острой фазы воспаления и возрастает в 2–4 раза к ее завершению и при хронизации процесса [51]. Уровень SAP повышен при всех формах амилоидоза, развивающегося в соединительных тканях, стенках сосудов, центральной нервной системе. В последние годы интерес к методам оценки SAP существенно возрос в связи с обнаружением его способности к взаимодействию с адипонектином и важной роли в атеросклеротическом процессе [52, 53].

Частота обнаружения прироста уровня CRP в крови при различных патологиях (по данным [45, 46]).

Выше 50 % случаев	Около 50 % случаев	Менее 25 % случаев
<p>а) Бактериальные сепсисы, ревматизм, ревматоидный эндокардит, туберкулез (поздние стадии), пневмококковые или другие бактериальные пневмонии, тиф, бактериальные менингиты, стрептококковые или стафилококковые инфекции, проказа.</p> <p>б) Микозы: аспергиллез, системная форма кокцидиомикоза.</p> <p>в) Паразитарные инвазии: малярия, сонная болезнь.</p> <p>г) Вирусные инфекции: оспа, грипп А, аденовирусные инфекции, эпидемический паротит, гепатиты А и В, COVID-19.</p> <p>д) Другие патологии: опухоли, инфаркт миокарда, полиартрит, ревматоидный артрит, тиреотоксикоз, васкулиты, обширные хирургические вмешательства или травмы</p>	<p>а) Вирусные инфекции: менингиты, бешенство, полиомиелит, вирус Коксаки В4, В5.</p> <p>б) Другие патологии: СКВ, гиперчувствительность II, III, IV типов, изменения клеточного состава крови</p>	<p>а) Вирусные инфекции: инфекционные мононуклеоз, некоторые менингиты, паротит.</p> <p>б) Другие патологии: эпилепсия, психозы, доброкачественные опухоли, врожденные кардиопатии, дискоидная красная волчанка, гиперчувствительность I типа, небольшие хирургические вмешательства, изменения состава крови</p>

Академик Рэм Викторович Петров – ведущий иммунолог России. С его именем связано развитие фундаментальных и прикладных проблем современной иммунологии, аллергологии и иммуногенетики, таких как радиационная иммунология, генетический контроль иммунного ответа, молекулярно-клеточные механизмы его регуляции и клеточных взаимодействий, создание принципиально новых лекарственных пре-

паратов иммуномодуляторов, разработка концепции и методологии оценки иммунного статуса, принципов конструирования вакцин нового поколения с повышенными иммунизирующими свойствами. И здесь важно отметить, что импульс, который был задан пионерской работой академика Р.В. Петрова в далеком 1959 г., также привел к формированию важного направления исследований роли и механизмов врожденного иммунитета.

■ Литература

1. Tillet W.S., Francis T.J. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 1930; 52 (4): 561–71. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.52.4.561>.
2. Иоффе В.И., Хай Л.М. К изучению серологии воспалительных процессов. Об «острофазовой» реакции. В кн.: Ежегодник ИЭМ АМН СССР. Ленинград, 1959: 238–52.
3. Anderson H.C., McCarty M. The occurrence in the rabbit of an acute phase protein analogous to human C-reactive protein. *J. Exp. Med.* 1951; 93 (1): 25–36. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.93.1.25>.
4. Kushner I., Rakita L., Kaplan M.H. Studies on acute phase protein. II. Localization of Cx-reactive protein in heart in induced myocardial infarction in rabbits. *J. Clin. Invest.* 1963; 42 (2): 286–92. URL: <https://doi.org/10.1172/jci104715>.
5. Kushner I., Somerville-Volanakis J. Studies of synovial and serum C-reactive protein in experimental arthritis in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1973; 142 (1): 112–14. URL: <https://doi.org/10.3181/00379727-142-36969>.
6. Пашинин П.М. С-реактивный белок. Ленинград : ВМедА, 1967.
7. Петров Р.В., Кабаков Е.Н. С-реактивный протеин. Клиническая медицина. 1959; 37 (5): 28–32.
8. Петров Р.В., Зарещкая Ю.М. Радиационная иммунология и трансплантация. Москва : Атомиздат, 1970.
9. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Манько В.М., Чередеев А.Н., Воробьев А.А., Трунова Л.А. Оценка иммунного статуса, иммунологический мониторинг – современные проблемы клинической иммунологии и аллергологии. *Иммунология.* 1994; 15 (6): 4–6.
10. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Оценка иммунного статуса человека в норме и при патологии. *Иммунология.* 1994; 15 (6): 6–10.
11. Nazarov P.G., Krylova I.B., Evdokimova N.R., Nezhinskaya G.I., Butyugov A.A. C-reactive protein: a pentraxin with anti-acetylcholine activity. *Life Sci.* 2007; 80 (24–25): 2337–41. URL: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.04.031>.
12. Нежинская Г.И., Лосев Н.А., Назаров П.Г., Сапронов Н.С. Влияние ацетилхолина и С-реактивного белка на регуляцию анафилактического шока у морских свинок. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2005; 68 (4): 49–52. eLIBRARY ID: 22569405.
13. DuClos T.W. The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens. *Mol. Biol. Rep.* 1996; 23 (3–4): 253–60. URL: <https://doi.org/10.1007/bf00351177>.
14. Young B., Gleeson M., Cripps A.W. C-reactive protein: a critical review. *Pathology.* 1991; 23 (1): 118–24. URL: <https://doi.org/10.3109/00313029109060809>.
15. Introna M., Alles V.V., Castellano M., Picardi G., De Gioia L., Bottazzai B., Peri G., Breviaro F., Salmona M., De Gregorio L., Dragani T.A., Srinivasan N., Blundell T.L., Hamilton T.A., Mantovani A. Cloning of mouse PTX3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood.* 1996; 87 (5): 1862–72. URL: <https://doi.org/10.1182/blood.v87.5.1862.1862>.
16. Omeis I.A., Hsu Y.C., Perin M.S. Mouse and human neuronal pentraxin 1 (NPTX1): conservation, genomic structure, and chromosomal localization. *Genomics.* 1996; 36 (3): 543–5. URL: <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0503>.
17. Hsu Y.C., Perin M.S. Human neuronal pentraxin II (NPTX2): conservation, genomic structure, and chromosomal localization. *Genomics.* 1995; 28 (2): 220–7. URL: <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1134>.
18. Noland T.D., Friday B.B., Maulit M.T., Gerton G.L. The sperm acrosomal matrix contains a novel member of the pentaxin family of calcium-dependent binding proteins. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (51): 32 607–14.
19. Reid M.S., Blobel C.P. Apexin, an acrosomal pentaxin. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (51): 32 615–20.
20. Steel D.M., Whitehead A.S. The major acute phase reactants : C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today.* 1994; 15 (2): 81–8. URL: [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90138-4).
21. Szalai A.J., Agrawal A., Greenhough T.J., Volanakis J.E. C-reactive protein: structural biology, gene expression, and host defense function. *Immunol. Res.* 1997; 16 (2): 127–36. URL: <https://doi.org/10.1007/bf02786357>.
22. Ripperger J., Fritz S., Richter K., Dreier B., Schneider K., Lochner K., Marschalek R., Hocke G., Lottspeich F., Fey G.H. Isola-

tion of two interleukin-6 response element binding proteins from acute phase rat liver. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995; 762 (1): 252–61. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb32330.x>.

23. Ganapathi M.K., May L.T., Schultz P., Brabenec A., Weinstein J., Sehgal P.B., Kushner I. Role of IL-6 in regulating synthesis of C-reactive protein and serum amyloid A in human hepatoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 157 (1): 271–8. URL: [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)80043-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(88)80043-3).

24. Majello B., Arcone R., Toniatti C., Ciliberto G. Constitutive and interleukin-6-induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *EMBO J.* 1990; 19 (2): 457–65. URL: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08131.x>.

25. Zhang D., Sun M., Samols D., Kushner I. STAT 3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (16): 9503–9. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9503>.

26. Yap S.H., Moshage H.J., Yazenberg B.P.C., Roelofs H.M.J., Bijzet J., Limburg P.C., Aarden L.A., van Rijswijk M.H. Tumor necrosis factor inhibits IL1 and/or IL6 stimulated synthesis of C-reactive protein and serum amyloid A in primary cultures of human hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1091 (3): 405–8. URL: [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(91\)90207-e](https://doi.org/10.1016/0167-4889(91)90207-e).

27. Ytoh Y., Takeuchi S., Shigemoto K., Kubo S., Handa S., Ishikawa N., Maruyama N. The strain-dependent constitutive expression of murine serum amuloid P component is regulated at the transcriptional level. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992; 1131 (2): 261–9. URL: [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90024-t](https://doi.org/10.1016/0167-4781(92)90024-t).

28. Iwanaga T., Wakasugi S., Inomoto T., Uehira M., Ohnishi S., Nishiguchi S., Araki K., Uno M., Miyazaki J.-I., Maeda S., Shimada K., Yamamura K.-I. Liver specific and high-level expression of human serum amyloid P component gene in transgenic mice. *Dev. Genet.* 1989; 10 (5): 365–71. URL: <https://doi.org/10.1002/dvg.1020100504>.

29. Lin L., Lu L., Cao W., Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9 (1): 727–32. URL: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1746199>.

30. Hurlimann J., Thorbecke G.J., Hochwald G.M. The liver as the site of C-reactive protein formation. *J. Exp. Med.* 1966; 123 (2): 365–78. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.123.2.365>.

31. Egenhofer C., Alsdorff K., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. Membrane-associated C-reactive protein on rat liver macrophages is synthesized within the macrophages, expressed as neo-C-reactive protein and bound through a C-reactive protein-specific membrane receptor. *Hepatology.* 1993; 18 (5): 1216–23. URL: <https://doi.org/10.1002/hep.1840180530>.

32. Назаров П.Г., Софронов Б.Н. Синтез С-реактивного белка лимфоидными клетками. В кн.: Медиаторы иммунного ответа в эксперименте и клинике. Москва, 1983: 112–3.

33. Ikuta T., Okubo H., Ishibashi H., Okumura Y., Hayashida K. Human lymphocytes synthesize C-reactive protein. *Inflammation.* 1986; 10 (3): 223–32. URL: <https://doi.org/10.1007/bf00916118>.

34. Murphy T.M., Baum L.L., Beaman K.D. Extrahepatic transcription of human C-reactive protein. *J. Exp. Med.* 1991; 173 (2): 495–8. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.173.2.495>.

35. Назаров П.Г. Реактанты острой фазы воспаления. Санкт-Петербург: Наука, 2001.

36. Полевщиков А.В., Назаров П.Г. С-реактивный белок и сывороточный амилоид P: роль в иммунорегуляции. *Иммунология.* 1998; 19 (4): 4–11. eLIBRARY ID: 22974210.

37. Назаров П.Г., Полевщиков А.В., Галкина Е.В., Бутюгов А.А., Исаков Д.В. Пентраксины в процессах неспецифической резистентности и иммунорегуляции. *Медицинская иммунология.* 1999; 1 (1–2): 59–72. eLIBRARY ID: 17850522.

38. Mold C., Baca R., Du Clos T.W. Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fcγ receptors. *J. Autoimmun.* 2002; 19 (3): 147–54. URL: <https://doi.org/10.1006/jaut.2002.0615>.

39. Nazarov P.G., Pronina A.P., Trulioff A.S. C-reactive protein: Fc-gamma receptor-mediated effects on human peripheral blood basophils in vitro. In: S. Nagasawa (ed.) C-Reactive Protein: New Research. Nova Science Publishers, 2009: 147–69. eLIBRARY ID: 21894896.

40. Nazarov P.G., Pronina A.P., Trulioff A.S. C-reactive protein: Fc-gamma receptor-mediated effects on human peripheral blood basophils in vitro. In: P.K. Vellis (ed.) Basophil Granulocytes. Nova Science Publishers, 2011: 95–121. eLIBRARY ID: 21880884.

41. Nazarov P.G., Pronina A.P. The influence of cholinergic agents on histamine release from HMC-1 human mast cell line stimulated with IgG, C-reactive protein and compound 48/80. *Life Sci.* 2012; 91 (21–22): 1053–7. URL: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.004>.

42. Трулёв А.С., Кудрявцев И.В., Назаров П.Г. Факторы острой фазы воспаления как модуляторы взаимодействия тучных клеток и фибробластов. *Бюллетень Восточно-Сибирского Научного Центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.* 2012; 85 (3–2): 319–22. eLIBRARY ID: 17903365.

43. Назаров П.Г., Мальцева О.Н., Тянянский Д.А., Агеева Е.В., Бородин Д.В., Денисенко А.Д. Влияние факторов воспаления на трансэндотелиальный транспорт липопротеинов сыровотки крови in vitro. Цитокины и воспаление. 2015; 14 (4): 59–64. eLIBRARY ID: 27196845.

44. Jeannin P., Jaillon S., Delneste Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20 (5): 530–7. URL: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.04.013>.

45. Moore B.J.B., June C.H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science.* 2020; 368 (6490): 473–4. URL: <https://doi.org/10.1126/science.abb8925>.

46. Hokama Y., Nakamura R.M. C-reactive protein: current status and future perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 1987; 1 (1): 15–27. URL: <https://doi.org/10.1002/jcla.1860010104>.

47. Ларина О.Н., Беккер А.М., Курданов Х.А., Курданова М.Х., Назаров П.Г. Острофазные белки крови у резидентов среднего-го-го с нарушением толерантности к глюкозе. I. С-реактивный белок. Цитокины и воспаление. 2014; 13 (1): 78–81. eLIBRARY ID: 21650534.

48. Shields M.J. A hypothesis resolving the apparently disparate activities of native and altered forms of human C-reactive protein. *Immunol. Res.* 1993; 12 (1): 37–47. URL: <https://doi.org/10.1007/bf02918367>.

49. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy.* 2016; 8 (8): 959–70. URL: <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0020>.

50. van Leeuwen M.A., van Rijswijk M.H. Acute phase proteins in the monitoring of inflammatory disorders. *Baillier's Clin. Rheumatol.* 1994; 8 (3): 531–54. URL: [https://doi.org/10.1016/s0950-3579\(05\)80114-1](https://doi.org/10.1016/s0950-3579(05)80114-1).

51. Pepys M.B., Baltz M.L. Acute phase protein with special reference to C-reactive protein and related proteins. *Adv. Immunol.* 1983; 34: 141–212. URL: [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60379-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60379-x).

52. Тянянский Д.А., Диде Э.Б., Шавва В.С., Пигаревский П.В., Мальцева С.В., Трулёв А.С., Агеева Е.В., Денисенко А.Д. Роль адипонектина в атерогенезе. В кн.: Метаболический синдром. Фундаментальные и клинические аспекты – от теории к практике. Санкт-Петербург: ИнформМед, 2018: 27–8. eLIBRARY ID: 36668706.

53. Пигаревский П.В., Яковлева О.Г., Мальцева С.В., Гусева В.А. Роль клеточной пролиферации в атерогенезе и при дестабилизации атеросклеротической бляшки у человека. *Медицинский академический журнал.* 2019; 19 (2): 7–12. URL: <https://doi.org/10.17816/MAJ1927-12>.

References

1. Tillet W.S., Francis T.J. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 1930; 52 (4): 561–71. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.52.4.561>.

2. Ioffe V.I., Khai L.M. To the study of serology of inflammatory processes. On the «acute phase» reaction. In: *Ezhogodnik IEM AMN SSSR.* Leningrad: Nauka, 1959: 238–52. (in Russian)

3. Anderson H.C., McCarty M. The occurrence in the rabbit of an acute phase protein analogues to human C-reactive protein. *J. Exp. Med.* 1951; 93 (1): 25–36. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.93.1.25>.

4. Kushner I., Rakita L., Kaplan M.H. Studies on acute phase protein. II. Localization of Cx-reactive protein in heart in induced myocardial infarction in rabbits. *J. Clin. Invest.* 1963; 42 (2): 286–92. URL: <https://doi.org/10.1172/jci104715>.

5. Kushner I., Somerville-Volanakis J. Studies of synovial and serum C-reactive protein in experimental arthritis in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1973; 142 (1): 112–14. URL: <https://doi.org/10.3181/00379727-142-36969>.

6. Pashinin P.M. C-reactive Protein. Leningrad: Voenno-Meditsinskaya Akademiya, 1967. (in Russian)
7. Petrov R.V., Kabakov E.N. C-reactive protein. *Klinicheskaya meditsina*. 1959; 37 (5): 28–32. (in Russian)
8. Petrov R.V., Zaretskaya Yu.M. Radiation immunology and transplantation. Moscow: Atomizdat, 1970. (in Russian)
9. Petrov R.V., Khaitov R.M., Man'ko V.M., Cheredeev A.N., Vorobyov A.A., Trunova L.A. Assessment of the immune status, immunological monitoring are the current problems of clinical immunology and allergology. *Immunologiya*. 1994; 15 (6): 4–6. (in Russian)
10. Petrov R.V., Khaitov R.M., Pinegin B.V. Assessment of the human immune status in normal and pathological conditions. *Immunologiya*. 1994; 15 (6): 6–10. (in Russian)
11. Nazarov P.G., Krylova I.B., Evdokimova N.R., Nezhinskaya G.I., Butyugov A.A. C-reactive protein: a pentraxin with anti-acetylcholine activity. *Life Sci*. 2007; 80 (24–25): 2337–41. URL: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.04.031>.
12. Nezhinskaia G.I., Losev N.A., Nazarov P.G., Sapronov N. Effect of acetylcholine and C-reactive protein on regulation of anaphylactic shock in guinea pigs. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2005; 68 (4): 49–52. eLIBRARY ID: 22569405. (in Russian)
13. DuClos T.W. The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens. *Mol. Biol. Rep.* 1996; 23 (3–4): 253–60. URL: <https://doi.org/10.1007/bf00351177>.
14. Young B., Gleeson M., Cripps A.W. C-reactive protein: a critical review. *Pathology*. 1991; 23 (1): 118–24. URL: <https://doi.org/10.3109/00313029109060809>.
15. Introna M., Alles V.V., Castellano M., Picardi G., De Gioia L., Bottazzai B., Peri G., Breviaro F., Salmona M., De Gregorio L., Dragani T.A., Srinivasan N., Blundell T.L., Hamilton T.A., Mantovani A. Cloning of mouse PTX3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood*. 1996; 87 (5): 1862–72. URL: <https://doi.org/10.1182/blood.v87.5.1862.1862>.
16. Omeis I.A., Hsu Y.C., Perin M.S. Mouse and human neuronal pentraxin 1 (NPTX1): conservation, genomic structure, and chromosomal localization. *Genomics*. 1996; 36 (3): 543–5. URL: <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0503>.
17. Hsu Y.C., Perin M.S. Human neuronal pentraxin II (NPTX2): conservation, genomic structure, and chromosomal localization. *Genomics*. 1995; 28 (2): 220–7. URL: <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1134>.
18. Noland T.D., Friday B.B., Maulit M.T., Gerton G.L. The sperm acrosomal matrix contains a novel member of the pentaxin family of calcium-dependent binding proteins. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (51): 32 607–14.
19. Reid M.S., Blobel C.P. Apexin, an acrosomal pentaxin. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (51): 32 615–20.
20. Steel D.M., Whitehead A.S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today*. 1994; 15 (2): 81–8. URL: [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90138-4).
21. Szalai A.J., Agrawal A., Greenhough T.J., Volanakis J.E. C-reactive protein: structural biology, gene expression, and host defense function. *Immunol. Res.* 1997; 16 (2): 127–36. URL: <https://doi.org/10.1007/bf02786357>.
22. Ripperger J., Fritz S., Richter K., Dreier B., Schneider K., Lochner K., Marschalek R., Hocke G., Lottspeich F., Fey G.H. Isolation of two interleukin-6 response element binding proteins from acute phase rat liver. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995; 762 (1): 252–61. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb32330.x>.
23. Ganapathi M.K., May L.T., Schultz P., Brabenec A., Weinstein J., Sehgal P.B., Kushner I. Role of IL-6 in regulating synthesis of C-reactive protein and serum amyloid A in human hepatoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 157 (1): 271–8. URL: [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)80043-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(88)80043-3).
24. Majello B., Arcone R., Toniatti C., Ciliberto G. Constitutive and interleukin-6-induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *EMBO J.* 1990; 19 (2): 457–65. URL: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08131.x>.
25. Zhang D., Sun M., Samols D., Kushner I. STAT 3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (16): 9503–9. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9503>.
26. Yap S.H., Moshage H.J., Yazenberg B.P.C., Roelofs H.M.J., Bijzet J., Limburg P.C., Aarden L.A., van Rijswijk M.H. Tumor necrosis factor inhibits IL1 and/or IL6 stimulated synthesis of C-reactive protein and serum amyloid A in primary cultures of human hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1991; 1091 (3): 405–8. URL: [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(91\)90207-e](https://doi.org/10.1016/0167-4889(91)90207-e).
27. Ytoh Y., Takeuchi S., Shigemoto K., Kubo S., Handa S., Ishikawa N., Maruyama N. The strain-dependent constitutive expression of murine serum amyloid P component is regulated at the transcriptional level. *Biochim. Biophys. Acta*. 1992; 1131 (2): 261–9. URL: [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90024-t](https://doi.org/10.1016/0167-4781(92)90024-t).
28. Iwanaga T., Wakasugi S., Inomoto T., Uehira M., Ohnishi S., Nishiguchi S., Araki K., Uno M., Miyazaki J.-I., Maeda S., Shimada K., Yamamura K.-I. Liver specific and high-level expression of human serum amyloid P component gene in transgenic mice. *Dev. Genet.* 1989; 10 (5): 365–71. URL: <https://doi.org/10.1002/dvg.1020100504>.
29. Lin L., Lu L., Cao W., Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9 (1): 727–32. URL: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1746199>.
30. Hurlimann J., Thorbecke G.J., Hochwald G.M. The liver as the site of C-reactive protein formation. *J. Exp. Med.* 1966; 123 (2): 365–78. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.123.2.365>.
31. Egenhofer C., Alsdorff K., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. Membrane-associated C-reactive protein on rat liver macrophages is synthesized within the macrophages, expressed as neo-C-reactive protein and bound through a C-reactive protein-specific membrane receptor. *Hepatology*. 1993; 18 (5): 1216–23. URL: <https://doi.org/10.1002/hep.1840180530>.
32. Nazarov P.G., Sofronov B.N. Synthesis of C-reactive protein by lymphoid cells. In: *Immune Response Mediators in an Experiment and Clinic*. Moscow, 1983: 112–3. (in Russian)
33. Ikuta T., Okubo H., Ishibashi H., Okumura Y., Hayashida K. Human lymphocytes synthesize C-reactive protein. *Inflammation*. 1986; 10 (3): 223–32. URL: <https://doi.org/10.1007/bf00916118>.
34. Murphy T.M., Baum L.L., Beaman K.D. Extrahepatic transcription of human C-reactive protein. *J. Exp. Med.* 1991; 173 (2): 495–8. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.173.2.495>.
35. Nazarov P.G. Reactants of the Acute Phase of Inflammation. Saint Petersburg: Nauka, 2001. (in Russian)
36. Polevshchikov A.V., Nazarov P.G. C-reactive protein and serum amyloid P: role in immunoregulation. *Immunologiya*. 1998; 19 (4): 4–11. eLIBRARY ID: 22974210. (in Russian)
37. Nazarov P.G., Polevshchikov A.V., Galkina E.V., Butyugov A.A., Isakov D.V. Pentraxins in the processes of non-specific resistance and immunoregulation. *Meditsinskaya immunologiya*. 1999; 1 (1–2): 59–72. eLIBRARY ID: 17850522. (in Russian)
38. Mold C., Baca R., Du Clos T.W. Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fcγ receptors. *J. Autoimmun.* 2002; 19 (3): 147–54. URL: <https://doi.org/10.1006/jaut.2002.0615>.
39. Nazarov P.G., Pronina A.P., Trulioff A.S. C-reactive protein: Fc-gamma receptor-mediated effects on human peripheral blood basophils in vitro. In: S. Nagasawa (ed.). *C-Reactive Protein: New Research*. Nova Science Publishers, 2009: 147–69. eLIBRARY ID: 21894896.
40. Nazarov P.G., Pronina A.P., Trulioff A.S. C-reactive protein: Fc-gamma receptor-mediated effects on human peripheral blood basophils in vitro. In: P.K. Vellis (ed.). *Basophil Granulocytes*. Nova Science Publishers, 2011: 95–121. eLIBRARY ID: 21880884.
41. Nazarov P.G., Pronina A.P. The influence of cholinergic agents on histamine release from HMC-1 human mast cell line stimulated with IgG, C-reactive protein and compound 48/80. *Life Sci.* 2012; 91 (21–22): 1053–7. URL: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.004>.
42. Trulioff S.A., Kudryavtsev I.V., Nazarov P.G. Factors of the acute phase of inflammation as modulators of the interaction of mast cells and fibroblasts. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo Nauchnogo Tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2012; 85 (3–2): 319–22. eLIBRARY ID: 17903365 (in Russian)
43. Nazarov P.G., Mal'tseva O.N., Tanyanskiy D.A., Ageeva E.V., Borodina D.V., Denisenko A.D. Influence of inflammation factors on transendothelial transport of blood serum lipoproteins in vitro. *Tsitokiny i vospalenie*. 2015; 14 (4): 59–64. eLIBRARY ID: 27196845. (in Russian)
44. Jeannin P., Jaillon S., Delneste Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20 (5): 530–7. URL: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.04.013>.
45. Moore B.J.B., June C.H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*. 2020; 368 (6490): 473–4. URL: <https://doi.org/10.1126/science.abb8925>.

46. Hokama Y., Nakamura R.M. C-reactive protein : current status and future perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 1987; 1 (1): 15–27. URL: <https://doi.org/10.1002/jcla.1860010104>.
47. Larina O.N., Bekker A.M., Kurdanov Kh.A., Kurdanova M.Kh., Nazarov P.G. Acute phase proteins in the blood of midland residents with impaired glucose tolerance. 1. C-reactive protein. *Tsitokiny i vospalenie.* 2014; 13 (1): 78–81. eLIBRARY ID: 21650534. (in Russian)
48. Shields M.J. A hypothesis resolving the apparently disparate activities of native and altered forms of human C-reactive protein. *Immunol. Res.* 1993; 12 (1): 37–47. URL; <https://doi.org/10.1007/bf02918367>.
49. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy.* 2016; 8 (8): 959–70. URL: <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0020>.
50. van Leeuwen M.A., van Rijswijk M.H. Acute phase proteins in the monitoring of inflammatory disorders. *Baillier's Clin. Rheumatol.* 1994; 8 (3): 531–54. URL: [https://doi.org/10.1016/s0950-3579\(05\)80114-1](https://doi.org/10.1016/s0950-3579(05)80114-1).
51. Pepys M.B., Baltz M.L. Acute phase protein with special reference to C-reactive protein and related proteins. *Adv. Immunol.* 1983; 34: 141–212. URL: [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60379-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60379-x).
52. Tanyanskiy D.A., Diezhe E.B., Shavva V.S., Pigarevskiy P.V., Mal'tseva S.V., Trulyev A.S., Ageeva E.V., Denisenko A.D. The role of adiponectin in atherogenesis. In: *Metabolic syndrome. Fundamental and clinical aspects – from theory to practice.* Saint Petersburg: InformMed, 2018: 27–8. eLIBRARY ID: 36668706. (in Russian)
53. Pigarevskiy P.V., Yakovleva O.G., Mal'tseva S.V., Guseva V.A. The role of cell proliferation in atherogenesis and in the destabilization of atherosclerotic plaque in human. *Meditinskiy akademicheskij zhurnal.* 2019; 19 (2): 7–12. URL: <https://doi.org/10.17816/MAJ1927-12>. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2020

Гурьянова С.В.^{1,2}, Хаитов Р.М.³

Глюкозаминилмурамилдипептид – ГМДП: воздействие на мукозальный иммунитет (к вопросу иммунотерапии и иммунопрофилактики)

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, 117997, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Медицинский институт, 117198, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Представлен анализ эффективности клинического применения препарата Ликопид[®], субстанцией которого является глюкозаминилмурамилдипептид – ГМДП. Многолетний опыт использования ГМДП при заболеваниях, ассоциированных со слизистыми оболочками организма, формирующих систему мукозального иммунитета, показал его высокую эффективность при терапии и профилактике. На примере работ, показывающих системное использование препарата Ликопид[®] в офтальмологии, лечении заболеваний дыхательных путей, включая острые респираторные заболевания у детей и взрослых, туберкулез, а также при заболеваниях желудочно-кишечного и урогенитального трактов. Продемонстрировано, что препарат эффективен при иммунопрофилактике различных заболеваний, предотвращает рецидивы острых респираторных инфекций, бактериальных и герпетических инфекций у детей и взрослых, проявляет эффективность в лечении и профилактике сезонных и аллергических заболеваний. Изученность механизма действия препарата, значительный спектр активности и отсутствие побочных эффектов являются основанием для рекомендаций широкого применения ГМДП в медицинской практике, иммунотерапии и иммунопрофилактике.

Ключевые слова: мукозальный иммунитет; глюкозаминилмурамилдипептид; врожденный иммунитет; иммунотерапия; иммунопрофилактика

Статья поступила 20.01.2020. Принята в печать 20.02.2020.

Для цитирования: Гурьянова С.В., Хаитов Р.М. Глюкозаминилмурамилдипептид – ГМДП: воздействие на мукозальный иммунитет (к вопросу иммунотерапии и иммунопрофилактики). Иммунология. 2020, 41 (2): 174–183. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-174-183

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Guryanova S.V.^{1,2}, Khaitov R.M.³

Glucosaminylmuramyldipeptide – GMDP: effect on mucosal immunity (on the issue of immunotherapy and immunoprophylaxis)

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, 117997, Moscow, Russian Federation

² Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Medical Institute, 117198, Moscow, Russian Federation

³ National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

Abstract

The analysis of the clinical application effectiveness of the drug Licopid[®] (the substance is glucosaminylmuramyldipeptide – GMDP), is discussed. Many years of experience using the

Для корреспонденции
Гурьянова Светлана Владимировна –
кандидат биологических наук,
научный сотрудник ФГБУН
«Институт биоорганической химии
им. акад. М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова» РАН,
Москва, Российская Федерация
E-mail: svgur@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-6186-2462>

drug Licopid in diseases associated with the mucous layers of the body, forming the mucosal immunity system, has shown high efficiency in therapy and prevention. On the example of clinical application showing the systemic use of the drug Licopid® in ophthalmology, the treatment of respiratory diseases, including acute respiratory children and adults infections, tuberculosis; diseases of the gastrointestinal and urogenital tracts, it has been demonstrated that Licopid® is effective in the immunoprophylaxis of various diseases, prevents relapse of acute respiratory infections, bacterial and herpetic children and adults infections, and is effective in the treatment and prevention of seasonal and allergic diseases. The study of the mechanism of Licopid® action, a wide range activity and the side effects absence are the basis for recommendations on the widespread use of GMDP in medical practice, immunotherapy and immunoprophylaxis.

Keywords: mucosal immunity; glucosaminyl muramyl dipeptide; innate immunity; immunotherapy; immunoprophylaxis

Received 20.01.2020. Accepted 20.02.2020.

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interests.

For citation: Guryanova S.V., Khaitov R.M. Glucosaminylmuramyl dipeptide – GMDP: effect on mucosal immunity (on the issue of immunotherapy and immunoprophylaxis). *Immunologiya*. 2020; 41 (2): 174–83. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-174-183 (in Russian)

For correspondence
Svetlana V. Guryanova –
PhD, Research Scientist,
Shemyakin-Ovchinnikov
Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation
E-mail: svgur@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-6186-2462>

Введение

Эпителий слизистых оболочек и кожных покровов является первой линией защиты от инфекции и препятствует проникновению патогенов [1–4]. Существует система многоуровневой защиты организма, которая реализуется как секреторными компонентами (слезная жидкость, слизь, слюна и т.д.), так и клеточными. Более 100 лет известно, что в состав эпителия желудочно-кишечного тракта и бронхов входит лимфоидная ткань: в 1875 г. Э.Э. Клейн обнаружил в структуре бронхов ткань, аналогичную открытой ранее в 1677 г. И.К. Пейером в слизистой кишечника [5]. В настоящее время слизистые оболочки полости рта, желудочно-кишечного тракта, бронхолегочной и урогенитальной систем, конъюнктивы рассматриваются как единая система мукозального иммунитета. Это дает основание использовать комплексный подход в диагностике и лечении заболеваний, обусловленных вовлечением слизистых оболочек в патологический процесс. При выборе способов терапии и профилактики необходимо ориентироваться на лекарственные средства, оказывающие системное действие. Таким препаратом является Ликопид®, активная субстанция которого глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) на протяжении нескольких десятилетий служит объектом научных исследований. В результате фундаментальных исследований обнаружен и хорошо изучен механизм действия ГМДП через NOD2-рецепторы врожденного иммунитета [6].

NOD2 рассматривается как ключевой рецептор врожденного иммунитета [7], осуществляющий регуляцию экспрессии TLR- и NLR-рецепторов, цитокинов, иммуноглобулинов, в том числе IgA, активность клеток макрофагального ряда, НК-клеток, нейтрофильных гранулоцитов, обеспечивающих первую линию защиты от инфекции [8]. NOD2-рецепторы представлены в имму-

нокомпетентных клетках [9] и в эпителиоцитах слизистых [10], что стало основанием для комплексного анализа воздействия ГМДП на слизистые оболочки организма.

Эффективность использования ГМДП при терапии слизистой оболочки глаз

При анализе воздействия ГМДП на слизистые оболочки глаз большинство исследований относится к коррекции вторичных иммунодефицитных состояний [11–14]. Есть также данные по применению ГМДП в офтальмологии при первичном иммунодефиците [15].

Наиболее значимые работы, показавшие эффективность ГМДП в офтальмологии, относящиеся к лечению вторичных иммунодефицитных состояний, были проведены в ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

Клинические испытания ГМДП были проведены в отделе инфекционных и аллергических заболеваний глаз в ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России с участием 95 пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями глаз различной этиологии и сопровождающимися признаками вторичной иммунологической недостаточности: постгерпетической кератопатией, бактериальными, грибковыми, акантамебными, инфекционно-аллергическими кератитами, весенним и атопическим кератоконъюнктивитом. В том числе было проведено двойное слепое контролируемое исследование под международным мониторингом с участием 70 пациентов со стромальным герпетическим кератитом [11, 12]. При включении ГМДП в комплексное лечение тяжелых герпетических кератитов и кератоконъюнктивитов отмечался выраженный клинический эффект. Значительно быстрее купировался воспалительный процесс в тканях глаза: сокращались сроки эпителизации роговицы ($8,14 \pm 0,76$ до $5,75 \pm 0,42$ дней; $p < 0,05$), резорб-

ции роговичной инфильтрации ($с\ 15,02 \pm 0,89$ до $10,54 \pm 0,5$ дней; $p < 0,001$), наблюдалось исчезновение ирита ($с\ 7,96 \pm 0,99$ до $5,78 \pm 0,43$; $p < 0,05$), повышалась острота зрения; сокращалась частота обнаружения антигена вируса простого герпеса в конъюнктиве больного глаза после курса лечения; сокращалось число рецидивов, удлинялись сроки ремиссии; сокращалась длительность лечения $с\ 15,2 \pm 0,87$ до $11,4 \pm 0,37$ дней [13].

Особый интерес представляет клинический случай X-сцепленной агаммаглобулинемии [15]. Несмотря на регулярную заместительную терапию при внутривенном введении иммуноглобулинов с поддержанием претрансфузионного уровня IgG не менее 8 г/л у пациента продолжали регистрироваться эпизоды обострения хронического конъюнктивита до 10 раз в год. Применение ГМДП в дополнение к внутривенному введению иммуноглобулинов способствовало улучшению качества жизни, снижению частоты обострений и симптоматики конъюнктивита, а также длительности использования антибиотиков. Настоящий пример иллюстрирует роль клеточных компонентов врожденного иммунного ответа в клинической манифестации недостаточности гуморального звена адаптивного иммунитета, а также подтверждает возможность дополнительной коррекции этих параметров для повышения эффективности стандартной заместительной терапии. Исследование было проведено в ФГОБУ ВО РостГМУ Минздрава России и МБУЗ «Городская больница №7» города Таганрога [15].

Таким образом, в многочисленных исследованиях терапии воспалительных заболеваний слизистой оболочки глаз вирусной и бактериальной этиологии, показана эффективность включения ГМДП в комплексную терапию как при вторичных иммунодефицитных состояниях [11–14], так и при первичном иммунодефиците [15].

Повышение эффективности терапии слизистой ротовой полости

Слизистые оболочки полости рта являются частью интегральной системы мукозального иммунитета [2, 16]. Одной из важнейших функций является защита от проникновения чужеродных антигенов и патогенных микроорганизмов, включая бактерии, вирусы, грибы, простейшие. Известно, что микробиом ротовой полости чрезвычайно разнообразен и насчитывает от нескольких сотен до несколько тысяч видов, включая даже *Archaea* [17]. В ротовой полости обитают условно-патогенные микроорганизмы, которые в случае ослабления иммунной системы хозяина могут стать причиной заболеваний не только ротовой полости, но и всего организма. В частности, *Porphyromonas gingivalis*, существующая в норме в ротовой полости, в случае значительного роста может стать причиной парадонтита, оказывать существенное влияние на иммунитет хозяина [18] и даже может поражать плаценту [19]. Участие *Staphylococcus epidermidis* регистрируется при акне, экземах, аллергических заболеваниях [20]. Слизистые ро-

товой полости должны не только обеспечивать защиту от патогенов и антигенов, но и регулировать интенсивность этого ответа. В случае неадекватно сильного ответа возможна острая воспалительная реакция или аллергизация процесса, при недостаточном ответе – переход в хроническую стадию, а при недостаточности иммунного надзора – появление опухолей. Координирование реакций организма на внешние стимулы осуществляется с помощью рецепторов на поверхности эпителиоцитов и иммунокомпетентных клеток и, в частности рецепторов врожденного иммунитета. Такое координирование возможно поддержать с помощью ГМДП: активация NOD2-рецептора приводит к коррекции нарушений гуморальных и клеточных факторов иммунитета, изменению состава микрофлоры.

Согласно опыту применения ГМДП при лечении заболеваний слизистой оболочки рта в ФГБУ «НМИЦ СЧЛХ» Минздрава России и ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, при терапии заболевания слизистой оболочки полости рта рецидивирующего герпетического стоматита (РГС), красного плоского лишая (КПЛ) и дисбактериоза у 45 пациентов применение ГМДП в комплексном лечении РГС позволило устранить симптомы интоксикации и болевого синдрома в первые дни болезни, скорректировать основные иммунологические параметры: синтез специфических антигенов и цитокинов [21–23].

ГМДП при назначении 1 мг 2 раза в день в течение 14 дней при дисбиотическом состоянии полости рта 76 пациентам способствовал увеличению бактерицидной активности ротовой жидкости, нормализации микробного пейзажа, исчезновению условнопатогенных микроорганизмов [24].

Показано, что профилактическое сублингвальное использование ГМДП увеличивает разнообразие комменсальной микрофлоры и уменьшает количество *Candida albicans*, *Clostridium* spp. и *Porphyromonas gingivalis*. Увеличение разнообразия комменсальной микрофлоры способствует формированию нормобиоценоза, препятствуя заселению ротовой полости патогенной микрофлорой [25].

Исследована терапевтическая эффективность препарата Ликопид® при лечении детей в возрасте от 1 года до 14 лет, страдающих РГС и аллергическими заболеваниями. Показано, что ГМДП в комплексе с традиционными методами лечения нормализует иммунологические показатели, благоприятно влияет на течение РГС и позволяет добиться устойчивой ремиссии аллергических заболеваний ($p < 0,001$) [26].

В клинических испытаниях показано, что при использовании ГМДП происходит коррекция гуморальных и клеточных факторов иммунитета, восстановление функций нейтрофильных гранулоцитов и нормализация микрофлоры [27]. Таким образом, полученные результаты позволяют рекомендовать профилактическое применение ГМДП с целью усиления защиты слизистых оболочек как от бактериальной, так и от вирусной инфекции.

Таблица 1. Динамика заболеваемости острыми респираторными инфекциями (ОРИ) в группах через 1 год после проведенного лечения в рамках плацебо-контролируемого исследования [прием препарата Ликопид® 1 мг (или плацебо) осуществляли 3 раза в день в течение 10 дней]

Группа (число пациентов)	До лечения	После лечения, %		
	4 эпизода ОРИ и более	отсутствие эпизодов ОРИ в течение года	1–2 эпизода ОРИ в течение года	3 эпизода ОРИ в течение года
Ликопид® (n = 100)	100	63	31	6
Плацебо (n = 50)	100	8	28	64

Оптимизация лечения заболеваний респираторного тракта

Особое место в системе мукозального иммунитета занимают слизистые оболочки респираторного тракта. Ежедневно через дыхательную систему человека проходит более 15 000 литров воздуха, содержащего бактерии, вирусы, механические частицы, чужеродные антигены, которые должны элиминироваться слизистой бронхолегочной системы, причем по силе реакции ответ должен быть адекватным стрессорному воздействию, в противном случае возможно развитие патологических состояний, в том числе аллергических. Заболевания, связанные со слизистыми респираторного тракта, наиболее распространены [28], особенно в регионах с развитым промышленным производством, не удивительно, что именно в этом направлении сделано наибольшее количество исследований с использованием ГМДП. В общей сложности опубликовано более 300 научных публикаций, где описаны исследования с участием 1200 пациентов. Клиницистами отмечен положительный эффект ГМДП на коррекцию факторов гуморального, в том числе цитокинов и иммуноглобулинов, и клеточного иммунитета, включая нормализацию соотношения популяций иммунных клеток [29] и повышение их функциональной активности [30]. Регистрировали положительное влияние ГМДП при терапии и профилактике заболеваний вирусной, грибковой, бактериальной этиологии [31, 32], в том числе туберкулеза взрослых и детей [33–39].

Профилактика ГМДП острых респираторных инфекций

Большой интерес вызывает плацебо-контролируемое исследование, проведенное Институтом иммунологии и клиницистами Нижнего Тагила [40], в котором показано, что применение ГМДП приводило к достоверному снижению (более чем в 7 раз) уровня респираторной заболеваемости в течение 1 года после проведенного курса иммунотерапии (табл. 1) и нормализации нарушенных параметров иммунного статуса (рис. 1).

В данном исследовании приняли участие 150 работников вредного коксохимического производства со стажем работы более 5 лет. У каждого участника частота эпизодов острых респираторных инфекций (ОРИ), а также обострений хронических воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей составляла не менее 4 раз в год. Иммунологическое обследование выявило вторичное иммунодефицитное состояние, проявлявшееся в воспалительных, а также аллергических реакциях в носоглотке, бронхах и легких. Необходимо отметить, что все участники к началу исследования находились в периоде ремиссии. Все пациенты получали по 1 табл. препарата Ликопид® 1 мг сублингвально в основной группе (100 участников), а в группе сравнения 50 человек получали плацебо 3 раза в день в течение 10 дней. Таблетки с препаратом и плацебо были идентичны по внешнему виду и произведены с учетом требований GMP (АО «Пептек», Москва, Российская Феде-

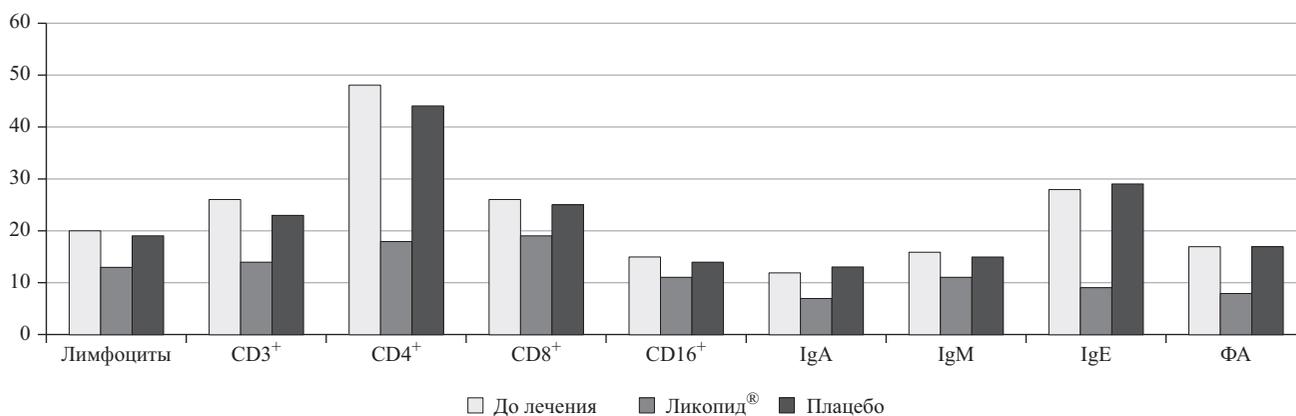


Рис. 1. Частота отклонений показателей иммунного статуса от референсных значений до и после лечения острых респираторных инфекций в группах реципиентов препарата Ликопид® и плацебо (в %) через 1 год после проведенного лечения в рамках плацебо-контролируемого исследования (прием препарата Ликопид® 1 мг или плацебо 3 раза в день в течение 10 дней)

Лимфоциты – абсолютное число лимфоцитов; ФА – фагоцитарная активность.

рация). Перед началом приема препарата или плацебо проводился осмотр, сбор анамнеза, лабораторно-иммунологические исследования. Повторные лабораторно-иммунологические исследования назначались через 12 дней после проведенной терапии. Все участники исследования находились под наблюдением в течение 1 года. Критерием эффективности стало количество обострений острых респираторных заболеваний в течение года после проведенной терапии. В качестве дополнительного критерия эффективности использовали динамические показатели иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE, уровни лимфоцитов и их субпопуляций, а также индекса фагоцитарной активности (ФА), определяемой с помощью оценки поглощения *S. aureus* нейтрофилами и моноцитами. При первичном лабораторном исследовании выявлено, что основные показатели иммунного статуса работников коксохимического производства отличаются от нормы. Основной особенностью является снижение абсолютного числа лимфоцитов и их субпопуляций, а также гиперглобулинемия IgA, IgM, и IgE. Эти изменения возникают на фоне воздействия на организм человека всего спектра неблагоприятных экологических факторов, характерных для данного производства. Такие изменения иммунного статуса характерны при нарушении активности клеток моноцитарно-макрофагального ряда.

После проведения профилактической терапии выявлено достоверное улучшение иммунологических показателей в основной группе обследованных, принимавших препарат Ликопид®, в отличие от группы реципиентов плацебо, у которых показатели остались без статистически значимых изменений (см. табл. 1). Так, число лиц, имевших пониженный уровень CD3⁺ и CD4⁺-Т-лимфоцитов, после лечения Ликопидом® снизилось почти в 3 и 3,5 раза соответственно, также снизилось в 3 раза число лиц с повышенным уровнем IgE. В течение года наблюдений число лиц, имеющих пониженную фагоцитарную активность, снизилось в 4 раза после приема Ликопида®. Положительная динамика показателей иммунитета коррелировала с клиническими проявлениями у пациентов, получавших Ликопид® и плацебо (см. рис. 1).

У 63 % пациентов, получавших Ликопид®, в течение года не было отмечено ни одного случая заболевания респираторного тракта, а в группе реципиентов плацебо этот показатель составлял лишь 8 %. Число болеющих ОРЗ в основной группе и группе сравнения составило 6 и 64 % соответственно. В результате исследования влияния Ликопида® на профилактику острых респираторных инфекций были сделаны следующие выводы:

- Прием препарата Ликопид® пациентами с выраженной сезонной заболеваемостью, проживающих в экологически неблагоприятном регионе, приводит к практически полному восстановлению нарушенных параметров иммунного статуса.
- Частота сезонной заболеваемости после проведенного курса лечения Ликопидом® снижается более

чем на 50 % по сравнению с группой реципиентов плацебо.

- Ликопид® показан для профилактики сезонной заболеваемости у жителей экологически неблагоприятных регионов.

При сравнении эффективности лечения взрослых пациентов с часто рецидивирующими острыми респираторными инфекциями при использовании двух схем применения Ликопида® – в дозе 1 мг/сут (30 пациентов) и 3 мг/сут (30 пациентов) в течение 14 дней установлено, что применение Ликопида® в дозе 3 мг/сут способствует более быстрой регрессии клинических проявлений острых респираторных заболеваний, усилению поглотительной способности, метаболической и протеазной активности нейтрофильных фагоцитов за счет активизации миелопероксидазы и катионных белков.

В другом исследовании оценивали целесообразность назначения ГМДП у часто и длительно болеющих детей (ОРВИ – 76,7%, хронический бронхит – 7,5%, тонзиллит – 6%) вне обострения [41]. Количество случаев заболевания оценивали до применения ГМДП и через 1 год после курса терапии. При снижении общего количества случаев заболеваний, уменьшении числа детей, относящихся к группе часто болеющих (ЧБД), выявлено достоверное изменение тяжести заболеваний за счет перехода средних форм в легкие. Через год после иммунокоррекции с применением ГМДП достоверно уменьшились не только частота заболеваний, но и длительность их течения.

В рамках проспективного, сравнительного, контролируемого, открытого исследования оценивали влияние использования различных иммунокорректирующих препаратов на частоту респираторных инфекций и их осложнений у 548 ЧБД младшего школьного возраста [42]. К ЧБД относили детей, переносящих четыре и более инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей в год. Применение ГМДП привело к статистически значимому снижению частоты респираторных инфекций, их осложнений и частоты использования антибиотиков, а также к восстановлению нарушенных параметров иммунного статуса: увеличилось число CD3⁺, CD4⁺, CD16⁺-клеток, снизились изначально повышенные уровни ФНОα и IgG. Авторы сделали вывод, что ГМДП предпочтителен для проведения профилактической иммунокоррекции у ЧБД младшего школьного возраста.

В другом проспективном, сравнительном, контролируемом, открытом исследовании с участием 76 детей раннего возраста ($2,4 \pm 0,16$ года) с рецидивирующим риносинуситом (не менее 3 эпизодов риносинусита в течение года) продемонстрировали преимущество комплексной терапии с ГМДП по сравнению с традиционной терапией – системной антибактериальной терапией амоксициллином/клавуланатом, местной противовоспалительной терапией мометазона фуруратом и ирригационной терапией изотоническими солевыми растворами: клинические признаки в группе пациентов, не получавших ГМДП, сохранялись на 3–4 дня дольше [43]. Таким образом, раннее назначение иммуностропной те-

рапии ГМДП при рецидивирующем риносинусите способствует более легкому течению заболевания, позволяет сократить сроки лечения и лекарственную нагрузку.

ГМДП активно используется для профилактики туберкулеза и в составе комплексной терапии у детей и взрослых [33–39]. В Республике Саха (Якутия) разработан метод комплексного превентивного лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза у детей. Применение противотуберкулезных препаратов совместно с ГМДП позволило повысить эффективность лечения, которое оценивали по пяти критериям и результатам динамического наблюдения за детьми в течение двух лет с момента использования метода. Авторы разработанного метода отмечают, что комплексное превентивное лечение с применением двух противотуберкулезных препаратов в лечебных дозировках совместно с ГМДП позволяет достичь снижения туберкулиновой чувствительности, нормализации показателей иммунитета, снижения частоты заболеваемости острыми респираторными заболеваниями, прироста весо-ростового показателя и предупреждения развития лекарственно-устойчивого туберкулеза у детей. Также показано, что ГМДП в комплексе с противотуберкулезными препаратами хорошо переносится детьми и не вызывает побочных эффектов. Применение ГМДП в противотуберкулезной практике у инфицированных лекарственно-устойчивыми штаммами детей доказало высокую эффективность этого средства для профилактики заболевания, что способствовало снижению заболеваемости туберкулезом в Республике Саха (Якутия) [33].

Обоснованием клинической эффективности ГМДП при комплексном лечении туберкулеза легких может служить обнаруженная в результате фундаментальных исследований способность мурамилпептидов влиять на выход микобактерий из dormantной формы. В результате микобактерии становятся доступными для противотуберкулезных лекарственных препаратов [44].

Эффективность ГМДП в лечении аллергических заболеваний респираторного тракта обусловлена нормализацией Th1/Th2-баланса [45] и широко описана в многочисленных исследованиях, в том числе на этапе санаторно-курортного лечения для иммунопрофилактики атопической бронхиальной астмы [46–51].

Включение ГМДП в терапию заболеваний желудочно-кишечного тракта

В слизистых желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) крайне необходимо своевременное выявление патогена и мобилизация иммунного ответа для предотвращения

дальнейшего развития инфекционного процесса. Важные результаты были получены в исследовании использования ГМДП при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, в частности, с применением ГМДП при проведении антихеликобактерной терапии [52]. Работы проводились в УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» Республики Беларусь. В исследовании участвовал 101 пациент (67 мужчин и 34 женщины, возраст – 18–65 лет, средний возраст – $43,7 \pm 13,4$ года) с язвой луковицы двенадцатиперстной кишки, вызванной *Helicobacter pylori*. Клинические исследования показали, что прием ГМДП при проведении классической 7-дневной схемы антихеликобактерной терапии повышает эрадикацию *Helicobacter pylori* без увеличения числа побочных эффектов. При этом установлено, что у пациентов-носителей *H. pylori* с язвой луковицы двенадцатиперстной кишки ГМДП целесообразно назначать при проведении 7-дневной схемы эрадикационной терапии, как альтернативу 14-дневной схемы лечения.

В связи с актуальностью проблемы своевременной диагностики и оптимальной терапии постинфекционного бактерионосительства при сальмонеллезах у детей в ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора были проведены исследования клинической и иммунологической эффективности ГМДП при сальмонеллезном постинфекционном бактерионосительстве [53]. В исследовании участвовали 28 детей, преимущественно 3-летнего возраста, с постинфекционным носительством сальмонелл *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. virchow* в течение длительного времени и при неэффективности предшествующей терапии. Установлена санирующая эффективность ГМДП у 96 % детей, что сопровождалось повышением фагоцитарных индексов, иммунорегуляторного индекса и усилением миграции лейкоцитов. Кроме того, показана целесообразность применения ГМДП для предотвращения осложнений при хирургических вмешательствах в области желудочно-кишечного тракта [54–56].

Применение ГМДП в лечении заболеваний урогенитального тракта

Поддержание нормоценоза слизистых урогенитального тракта имеет большое значение для поддержания здоровья взрослого населения и сохранения его репродуктивных функций. Большое количество исследований влияния ГМДП на слизистые оболочки урогенитального тракта обусловлено его способностью к активации местного и системного иммунитета и, как следствие,

Таблица 2. Частота рецидивов папилломавирусной инфекции шейки матки у пациенток, получавших лазеродеструкцию и через 7 дней 100 (1-я группа) или 200 мг (2-я группа) ГМДП или плацебо

	Группа				
	1-я		2-я		
терапия	через 6 мес	через 12 мес	терапия	через 6 мес	через 12 мес
ГМДП (n = 24)	–	2 (8,3 %)	ГМДП (n = 28)	–	1 (3,6 %)
Плацебо (n = 6)	2 (33,3 %)	2 (33,3 %)	Плацебо (n = 5)	2 (40 %)	1 (20 %)

Таблица 3. Результаты комплексного лечения пациентов с папилломавирусной инфекцией с применением ГМДП после лазеродеструкции (1 и 2-я группы) или до лазеродеструкции (3-я группа)

Результат лечения	Группа, n (%)			
	1-я	2-я	3-я	Плацебо 1-я группа / 2-я группа
Полное выздоровление	23 (76,7 %)	28 (93,3 %)	15 (75,5 %)	6 (60 %) / 5 (50 %)
Положительная динамика	7 (23,3 %)	2 (7,7 %)	5 (25 %)	2 (20 %) / 3 (30 %)
Отсутствие эффекта	0	0	0	2 (20 %) / 2 (20 %)

эффективностью в терапии данных заболеваний. ГМДП позволяет повысить эффективность комплексной терапии, снизить количество рецидивов и широко используется специалистами в комплексе с лазеродеструкцией папиллом и кондилом [57–64].

В плацебо-контролируемом лечении 100 пациентов с локальным и распространенным кондиломатозом шейки матки показана эффективность применения ГМДП в курсовой дозе 100 и 200 мг после лазеродеструкции [61]. Через 6 и 12 мес после проведенного лечения у пациентов с полным выздоровлением рецидивы были выявлены у 8,3 % (1-я группа – ГМДП в курсовой дозе 100 мг) и 3,6 % (2-я группа – ГМДП в курсовой дозе 200 мг) пациентов. В соответствующих группах сравнения (только лазеродеструкция) рецидивы выявлялись гораздо чаще: 66,6 % – в 1-й группе, 60 % – во 2-й (табл. 3). Полученные данные демонстрируют гораздо более эффективное воздействие ГМДП в курсовой дозе 200 мг (по 20 мг/сут в течение 10 дней после лазеродеструкции).

Показана высокая эффективность ГМДП при профилактике и терапии заболеваний не только вирусной, но и бактериальной этиологии, в частности при профилактике гнойных воспалительных заболеваний придатков матки [62], при лечении бактериального вагиноза [63], хламидийной инфекции [64], в комплексном лечении миомы матки [65].

Таким образом, препарат действует на весь спектр патологий слизистых оболочек и заболеваний, сопутствующим этим патологиям.

Заключение

Анализ проведенных исследований позволяет утверждать, что ГМДП, который взаимодействует с NOD2-

рецепторами врожденного иммунитета, осуществляет многоуровневое воздействие на мукозальный иммунитет, регулирует деятельность эпителиоцитов слизистых покровов на уровне местного и системного иммунитета, корректируя его гуморальное и клеточное звено. Муцины и секреторный IgA, присутствующие в слизистых оболочках, взаимодействуют с патогенами и препятствуют их адгезии на эпителиоцитах. Активация внутриклеточных NOD2-рецепторов приводит к увеличению синтеза иммуноглобулинов, хемокинов, интерферонов и других цитокинов, которые привлекают нейтрофилы и натуральные киллеры для уничтожения зараженных клеток.

Препарат на основе мурамилпептида ГМДП – Ликопид® – успешно используется для активации противомикробной защиты у детей и взрослых, является безопасным и эффективным индуктором интерферонов, иммуноглобулинов и цитокинов. Препарат эффективен при иммунопрофилактике заболеваний, предотвращает рецидивы острых респираторных инфекций, бактериальных и герпетических инфекций, проявляет эффективность в иммунотерапии и профилактике сезонных и аллергических заболеваний.

К основным достоинствам препарата следует отнести его эффективность, высокий профиль безопасности, хорошую изученность механизма действия, основанную на исследовании функционирования специфического NOD2-рецептора врожденного иммунитета. Многочисленные зарубежные и отечественные фундаментальные научные исследования участия NOD2-рецептора в регуляции врожденной и адаптивной иммунной системы являются основанием для разработки новых рекомендаций, расширения показаний и дальнейшего применения ГМДП в медицинской практике, иммунотерапии и иммунопрофилактике.

Литература

1. Хаитов Р.М. Иммунология : учебник. 3-е изд. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016: 496 с.
2. Хаитов Р.М., Гариб Ф.Ю. Иммунология : атлас. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2020: 416 с.
3. Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность. Иммунология. 2020; 41 (2): 107–113.
4. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Пашенков М.В. Эпителиальные клетки дыхательных путей как равноправные участники врожденного иммунитета и потенциальные мишени для иммунотропных средств. Иммунология. 2020; 41 (2): 107–113.
5. Bienenstock J., Befus D. Gut- and bronchus-associated lymphoid tissue. Am. J. Anat. 1984; 170 (3): 437–45.
6. Meshcheryakova E., Makarov E., Philpott D., Andronova T., Ivanov V. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophilic

derivatives of N-acetylglucosaminy N-acetylmuramyl peptides. Vaccine. 2007; 25: 4515–20.

7. Negroni A., Pierdomenico M., Cucchiara S., Stronati L. NOD2 and inflammation: current insights. J. Inflamm. Res. 2018; 11: 49–60.

8. 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.

9. Okumura S., Yuki K., Kobayashi R., Okamura S., Ohmori K., Saito H. et al. Hyperexpression of NOD2 in intestinal mast cells of Crohn's disease patients: preferential expression of inflammatory cell-recruiting molecules via NOD2 in mast cells. Clin. Immunol. 2009; 130: 175–85. DOI: 10.1016/j.clim.2008.08.027.

10. Sidiq T., Yoshihama S., Downs I., Kobayashi K.S. Nod2: a critical regulator of ileal microbiota and Crohn's disease. Front. Immunol. 2016; 7: 367.

11. Майчук Ю.Ф. Десятилетний опыт применения иммуномодулятора Ликопада в комплексной терапии воспалительных заболеваний глаз. Рефракционная хирургия и офтальмология. 2005; 5 (2): 52–7.
12. Майчук Ю.Ф. Аллергические конъюнктивиты и аллергическая астма. Диагностика, клиника, лечение. Рефракционная хирургия и офтальмология. 2005; 5 (4): 24–30.
13. Майчук Ю.Ф., Поздняков В.И., Позднякова В.В. Комплексная терапия тяжелых воспалительных заболеваний глаз с применением иммуномодуляторов и средств специфического лечения. Москва, 2010: 18 с.
14. Иванова О.Н., Софронеева О.Л. Лечение вирусного кератита. Уральский медицинский журнал. 2019; 6 (174): 128–32.
15. Сизякина Л.П., Андреева И.И., Петручик С.В. Оптимизация терапии пациента с генетическим дефектом антителопродукции. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2019; 23 (4): 405–11. DOI: 10.22363/2313-0245-2019-23-4-405-411.
16. Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Слободенюк В.В., Караулов А.В. Микробиоценозы открытых полостей и мукозальный иммунитет. Эффективная фармакотерапия. 2013; 27: 6–12.
17. Wade W.G. Detection and culture of novel oral Bacteria. In: N.S. Jakobovics, R.J. Palmer (eds). Oral Microbial Ecology – Current Research and New Perspectives. Norfolk : Caister Academic Press, 2013: 212 p.
18. Mysak J., Podzimek S., Sommerova P., Lyuya-Mi Y., Bartova J., Janatova T., Prochazkova J., Duskova J. Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. J. Immunol. Res. 2014; 2014: 4760688. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/4760688>.
19. Ye C., Katagiri S., Miyasaka N., Kobayashi H., Khemwong T., Nagasawa T., Izumi Y. The periodontopathic bacteria in placenta, saliva and subgingival plaque of threatened preterm labor and preterm low birth weight cases: a longitudinal study in Japanese pregnant women. Clin. Oral Investig. 2020 Apr 24. DOI: 10.1007/s00784-020-03287-4.
20. Claudel J.P., Auffret N., Leccia M.T., Poli F., Corvec S., Dréno B. A potential new player in the physiopathology of acne? Dermatology. 2019; 235 (4): 287–94.
21. Hon K.L., Tsang Y.C., Pong N.H., Leung T.F., Ip M. Exploring Staphylococcus epidermidis in atopic eczema: friend or foe? Clin. Exp. Dermatol. 2016; 41 (6): 659–63. DOI: 10.1111/ced.12866.
22. Рабинович О.Ф., Ханухова Л.М., Пинегин Б.В. Влияние иммуномодулятора ликопада на синтез цитокинов и активационные молекулы лимфоцитов периферической крови больных с красным плоским лишаем. Стоматология. 2000; 79 (2): 6–9.
23. Петрова Л.В., Ильина Л.В. Местное применение циклоспорина А в терапии различных клинических форм красного плоского лишая слизистой оболочки рта. Вестник дерматологии и венерологии. 2005; 2: 12–5.
24. Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Абрамова Е.С. Применение ликопада в комплексной терапии дисбактериоза полости рта. Стоматология. 2013; 92 (1): 40–2.
25. 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.
26. Балаболкин И.И., Кузнецова Н.И., Кузнецова О.Ю. Изменения на фоне лечения ликопадом иммунного статуса детей с рецидивирующим герпетическим стоматитом, страдающих аллергическими заболеваниями. Стоматология. 2004; 3: 49–52.
27. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Неделько Н.А. Способ иммунокоррекции ликопадом нарушений местного иммунитета у больных с острыми одонтогенными периоститами. Стоматолог-практик. 2006; 12 (148): 30–1.
28. Burney P., Jarvis D., Perez-Padilla R. The global burden of chronic respiratory disease in adults. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2015; 19 (1): 10–20.
29. Пинегин Б.В., Пашенков М.В. Иммуностимуляторы мурамилпептидной природы в лечении и профилактике инфекционно-воспалительных процессов. Иммунология. 2019; 3: 65–71.
30. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Клещенко Е.И., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Шинкарева О.Н., Малиновская В.В., Выжлова Е.Н. Новые подходы к проведению интерферон- и иммуномодулирующей терапии у иммунокомпрометированных детей с возвратными острыми респираторными вирусными инфекциями, ассоциированными с герпесвирусными инфекциями. Лечащий врач. 2014; 4: 107–11.
31. Стагниева И.В., Симбирцев А.С. Эффективность иммуномодулирующей терапии у больных риносинуситом. Медицинская иммунология. 2015; 17 (5): 423–30.
32. Филатова С.В., Пинегин Б.В., Симонова А.В., Артемьев М.Е., Голубева Н.М. Клинико-иммунологическая эффективность Ликопада при консервативном лечении больных хроническим тонзиллитом и хроническим синуситом. Вестник оториноларингологии. 2001; 5: 26–8.
33. Лугинова Е.Ф. Методика превентивного лечения детей, инфицированных лекарственно-устойчивыми штаммами микобактерий туберкулеза и с проявлениями иммунобиологических нарушений. Якутский медицинский журнал. 2007; (1): 16–20.
34. Сухов В.М., Гнездилова Е.В. О целесообразности использования Ликопада в комплексной терапии туберкулезной инфекции. Terra Medica. 2003; 1: 27–9.
35. Андропова Т.М. Применение иммуномодулятора ликопада в комплексном лечении туберкулеза легких. Проблемы туберкулеза. 2002; 3: 21–5.
36. Кисина Т.Е., Фрейдлин И.С., Петрова А.А. Влияние иммуномодулятора ликопада *in vitro* на гранулоциты периферической крови больных туберкулезом. Медицинский академический журнал. 2004; 4 (4): 29.
37. Свистунова А.С., Аршинова С.С., Климова С.В., Симонова А.В., Мазуров Д.В., Голубева Н.Н., Андропова Т.М. Клиническая и иммунологическая эффективность иммуномодулятора ликопада при туберкулезе легких. Иммунология. 2000; 21 (5): 59–62.
38. Ющенко А.А. Сравнительная оценка влияния лейкинферона и ликопада на факторы микробичности фагоцитов при экспериментальной лепре. В кн.: Иммунодиагностика и иммуно-реабилитация при лепре, туберкулезе и других хронических заболеваниях. 1998: 96–7.
39. Литвинов В. И. Применение в комплексной терапии туберкулеза иммуноотропного средства ликопада. В кн.: Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии. 1998: 299.
40. Серкова Н.А., Серков И.Л., Кулаков А.В. Использование нового отечественного иммуномодулятора Ликопада для снижения сезонной заболеваемости. Иммунология. 2000; 3: 62–3.
41. Кирюхин А.В., Парфенова Н.А., Максимова Т.А., Шенюгина Н.А., Львов А.В., Чумакова М.М., Андропова Т.М. Оптимизация лечения часто и длительно болеющих детей: иммунокоррекция ликопадом. Российский педиатрический журнал. 2001; 5: 27–9.
42. Майоров Р.В., Черешнева М.В., Верзилин С.Д., Черешнев В.А. Эффективность применения иммунокорректирующих препаратов для профилактики респираторных инфекций и их осложнений у часто болеющих детей младшего школьного возраста. Медицинская иммунология. 2013; 15 (3): 255–62.
43. Чопя В.В., Потемкина Г.А. Сравнительная характеристика эффективности лечения больных с часто рецидивирующими острыми респираторными инфекциями на фоне иммунодефицитных нарушений с использованием препарата Ликопад. Врачебное дело. 2013; 2: 106–17.
44. Nikitushkin V.D., Demina G.R., Shleeva M.O., Guryanova S.V., Ruggiero A., Berisio R., Kaprelyants A.S. A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria. FEBS J. 2015; 282 (13): 2500–11. DOI: 10.1111/febs.13292.
45. 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.
46. Козлов И.Г., Гурьянова С.В., Колесникова Н.В., Андропова Т.М. Мурамилпептиды и другие агонисты рецепторов врожденного иммунитета в комплексной терапии аллергических заболеваний. Российский аллергологический журнал. 2015; 5: 59–67.
47. Козлов И.Г., Колесникова Н.В., Воронина Е.В., Гурьянова С.В., Андропова Т.М. Глюкозаминилмурамилдипептид и другие агонисты рецепторов врожденного иммунитета в патогенетической терапии аллергических заболеваний. Аллергология и иммунология. 2013; 14 (4): 281–7.
48. Ягубян Р.С., Сизякина Л.П. эффективность аллерген-специфической иммунотерапии у больных сезонным аллергическим ринитом, осложненным синдромом вторичной иммунной недостаточности. Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2012; 2: 55–8.
49. Баранова Н.И., Молотилова Б.А., Костина Е.М. Иммунотерапия у больных с бронхиальной астмой и аллергическим ри-

нитом. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008; (4): 32–8.

50. Вебер В.Р., Мороз Б.Т. Противоаллергические средства и иммуномодуляторы. В кн.: Клиническая фармакология для стоматологов. Санкт-Петербург: Человек, 2008.

51. Кеворков Н.Н., Бахметьев Б.А., Черешнев В.А. Эффективность комплексной иммунотерапии при инфекционно-аллергической бронхиальной астме (БА). *International Journal of Immunorehabilitation*. 1997; 7: 105–7.

52. Конорев М.Р. Применение иммуномодулятора ликопада при проведении антихеликобактерной терапии первого выбора. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2012; 1: 45–50.

53. Милюткина Л.Н., Голубев А.О. Опыт применения Ликопада для санации постинфекционного сальмонеллезного бактерионосительства у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2015; 4: 100–8.

54. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Бутаков А.А. Иммунотерапия инфекционных послеоперационных осложнений с помощью нового иммуностимулятора гликопина. *Иммунология*. 1994; 2: 47–50.

55. Карсонова М.И., Пинегин Б.В., Хаитов Р.М. Иммунокорректирующая терапия при хирургической инфекции. *Анналы хирургической гепатологии*. 1999; 4 (1): 88–96.

56. Чернецова Л.Ф., Зотов П.Б., Сабиров А.Х. Применение Ликопада в лечении больных с распространенным желудочно-кишечного тракта. *Медицинская панорама*. 2003; 5: 44–5.

57. Макацария А.Д. Эффективность и безопасность глюкозаминилмурамилпептида в лечении заболеваний, ассоциированных с вирусом папилломы человека: систематический обзор. *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2019; 13 (2): 132–54.

58. Иванова О.Н., Аргунова Е.Ф. Изучение особенностей иммунитета у детей с множественными папилломами. *Якутский медицинский журнал*. 2018; (3): 107–9.

59. Пинегин Б.В., Минкина Г.Н. Влияние глюкозаминилмурамилдипептида на иммунный статус и клиническое состояние больных с поражением шейки матки вирусом папилломы человека. *Иммунология*. 1994; 3: 46–9.

60. Столярова У.В., Хворостухина Н.Ф. Комплексное лечение папилломовирусной инфекции шейки матки. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2014; 16 (4): 1456–8.

61. Манухин И.Б., Минкина Г.М., Высоцкий М.М., Харлова О.Г. Комплексное лечение пациентов с локальным и распространенным кондиломатозом шейки матки. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2005; 4 (4): 22–6.

62. Смирнова И.В. Профилактика гнойных воспалительных заболеваний придатков матки с помощью иммуномодулятора «Ликопид». *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2004; 2: 25–8.

63. Пынзарь М.А., Агикова Л.А., Минкина Г.Н., Андропова Т.Н., Пинегин Б.В. Опыт клинического применения иммуномодулятора ликопада у больных с бактериальным вагинозом. *Иммунология*. 1998; 5: 63–4.

64. Чернецова Л.Ф., Болтович А.В., Зорина Л.И., Субач Е.Б. Ликопид и циклоферон в комплексном лечении хламидийной генитальной инфекции у женщин. *Ремедиум. Приволжье*. 2003; 6: 30–1.

65. Тихомиров А.Л., Хольнов А.И. Иммунологические аспекты и клиническое значение применения Ликопада в комплексном консервативном лечении больных с миомой матки. *Качество жизни. Медицина*. 2008; 2: 45–8.

■ References

1. Khaitov R.M. *Immunology*. Textbook. 3rd ed. Moscow: GEO-TAR-Media, 2016: 496 p. (in Russian)

2. Khaitov R.M., Garib F.Yu. *Immunology*. Atlas. Moscow: GEO-TAR-Media, 2020: 416 p. (in Russian)

3. Khaitov R.M. Immunomodulators: myths and reality. *Immunologiya*. 2020; 41 (2): 101–6. (in Russian)

4. Khaitov R.M., Pinegin B.V., Pashchenkov M.V. Epithelial cells of the respiratory tract as equal participants of innate immunity and potential target for immunotropic drugs. *Immunologiya*. 2020; 41 (2): 107–13. (in Russian)

5. Bienenstock J., Befus D. Gut- and bronchus-associated lymphoid tissue. *Am. J. Anat.* 1984; 170 (3): 437–45.

6. Meshcheryakova E., Makarov E., Philpott D., Andronova T., Ivanov V. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophylic derivatives of N-acetylglucosamine N-acetylmuramyl peptides. *Vaccine*. 2007; 25: 4515–20.

7. Negroni A., Pierdomenico M., Cucchiara S., Stronati L. NOD2 and inflammation: current insights. *J. Inflamm. Res.* 2018; 11: 49–60.

8. 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.

9. Okumura S., Yuki K., Kobayashi R., Okamura S., Ohmori K., Saito H., et al. Hyperexpression of NOD2 in intestinal mast cells of Crohn's disease patients: preferential expression of inflammatory cell-recruiting molecules via NOD2 in mast cells. *Clin. Immunol.* 2009; 130: 175–85. DOI: 10.1016/j.clim.2008.08.027.

10. Sidiq T., Yoshihama S., Downs I., Kobayashi K.S. Nod2: a critical regulator of ileal microbiota and Crohn's disease. *Front. Immunol.* 2016; 7: 367.

11. Maychuk Yu.F. Ten years of experience with the use of the Lycopid immunomodulator in the treatment of inflammatory eye diseases. *Refraktsionnaya khirurgiya i oftal'mologiya*. 2005; 5 (2): 52–7. (in Russian)

12. Maychuk Yu.F. Allergic conjunctivitis and allergic asthma. Diagnosis, clinic, treatment. *Refraktsionnaya khirurgiya i oftal'mologiya*. 2005; 5 (4): 24–30. (in Russian)

13. Maychuk Yu.F., Pozdnyakov V.I., Pozdnyakova V.V. Complex therapy of severe inflammatory eye diseases using immunomodulators and specific treatment agents. Moscow, 2010: 18 p. (in Russian)

14. Ivanova O.N., Sofroneeva O.L. Treatment of viral keratitis. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2019; 6 (174): 128–32. (in Russian)

15. Szyakina L.P., Andreeva I.I., Petrukhin S.V. Optimization of therapy for a patient with a genetic defect in antibody production. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Meditsina*. 2019; 23 (4): 405–11. DOI: 10.22363/2313-0245-2019-23-4-405-411. (in Russian)

16. Afanas'ev S.S., Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Afanas'ev M.S., Slobodenyuk V.V., Karaulov A.V. Microbiocenoses of open cavities and mucosal immunity. *Effektivnaya farmakologiya*. 2013; 27: 6–12. (in Russian)

17. Wade W.G. Detection and culture of novel oral Bacteria. In: N.S. Jakobovics, R.J. Palmer (eds). *Oral Microbial Ecology – Current Research and New Perspectives*. Norfolk: Caister Academic Press, 2013: 212 p.

18. Mysak J., Podzimek S., Sommerova P., Lyuya-Mi Y., Bartova J., Janatova T., Prochazkova J., Duskova J. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014: 4760688. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/4760688>.

19. Ye C., Katagiri S., Miyasaka N., Kobayashi H., Khemwong T., Nagasawa T., Izumi Y. The periodontopathic bacteria in placenta, saliva and subgingival plaque of threatened preterm labor and preterm low birth weight cases: a longitudinal study in Japanese pregnant women. *Clin. Oral Investig.* 2020 Apr 24. DOI: 10.1007/s00784-020-03287-4.

20. Claudel J.P., Auffret N., Leccia M.T., Poli F., Corvec S., Dréno B. A potential new player in the physiopathology of acne? *Dermatology*. 2019; 235 (4): 287–94.

21. Hon K.L., Tsang Y.C., Pong N.H., Leung T.F., Ip M. Exploring *Staphylococcus epidermidis* in atopic eczema: friend or foe? *Clin. Exp. Dermatol.* 2016; 41 (6): 659–63. DOI: 10.1111/ced.12866.

22. Rabinovich O.F., Hanukhova L.M., Pinegin B.V. The effect of the immunomodulator of lycopid on the synthesis of cytokines and activation molecules of peripheral blood lymphocytes in patients with lichen planus. *Stomatologiya*. 2000; 79 (2): 6–9. (in Russian)

23. Petrova L.V., Il'ina L.V. Topical use of cyclosporin A in the treatment of various clinical forms of lichen planus. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2005; 2: 12–5. (in Russian)

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

25. 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 composition of the microflora of the oral cavity. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 34–40. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16005. (in Russian)

26. Balabolkin I.I., Kuznetsova N.I., Kuznetsova O.Yu. Changes during treatment with lycopide in the immune status of children with recurrent herpetic stomatitis, suffering from allergic diseases. *Stomatologiya*. 2004; 3: 49–52. (in Russian)
27. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Nedel'ko N.A. Method for immunocorrection of lycopide with local immunity disorders in patients with acute odontogenic periostitis. *Stomatolog-praktik*. 2006; 12 (148): 30–1. (in Russian)
28. Burney P., Jarvis D., Perez-Padilla R. The global burden of chronic respiratory disease in adults. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2015; 19 (1): 10–20.
29. Pinegin B.V., Pashchenkov M.V. Muramyl peptide immunostimulants in the treatment and prevention of infectious and inflammatory processes. *Immunologiya*. 2019; 3: 65–71. (in Russian)
30. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Kleshchenko E.I., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Shinkareva O.N., Malinovskaya V.V., Vyzhlova E.N. New approaches to conducting interferon and immunomodulating therapy in immunocompromised children with recurrent acute respiratory viral infections associated with herpesvirus infections. *Lechashchii vrach*. 2014; 4: 107–11. (in Russian)
31. Stagnieva I.V., Simbirtsev A.S. The effectiveness of immunomodulating therapy in patients with rhinosinusitis. *Meditinskaya immunologiya*. 2015; 17 (5): 423–30. (in Russian)
32. Filatova S.V., Pinegin B.V., Simonova A.V., Artem'ev M.E., Golubeva N.M. Clinical and immunological efficacy of Lycopid in the conservative treatment of patients with chronic tonsillitis and chronic sinusitis. *Vestnik otorinolaringologii*. 2001; 5: 26–8. (in Russian)
33. Luginova E.F. Methods of preventive treatment of children infected with drug-resistant strains of mycobacterium tuberculosis and with manifestations of immunobiological disorders. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal*. 2007; (1): 16–20. (in Russian)
34. Sukhov V.M., Gnezdilova E.V. On the feasibility of using Licopid in the treatment of tuberculosis infection. *Terra Medica*. 2003; 1: 27–9. (in Russian)
35. Andronova T.M. The use of the immunomodulator lycopid in the complex treatment of pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza*. 2002; 3: 21–5. (in Russian)
36. Kisina T.E., Freidlin I.S., Petrova A.A. In vitro effect of an immunomodulator of lycopid on granulocytes of the peripheral blood of tuberculosis patients. *Meditinskiy akademicheskii zhurnal*. 2004; 4 (4): 29. (in Russian)
37. Svistunova A.S., Arshinova S.S., Klimova S.V., Simonova A.V., Mazurov D.V., Golubeva N.M., Andronova T.M. Clinical and immunological efficiency of immunomodulator licopide in pulmonary tuberculosis. *Immunologiya*. 2000; 21 (5): 59–62. (in Russian)
38. Yushchenko A.A. Comparative evaluation of the effect of leukiniferon and lycopid on phagocytic microbicidal factors in experimental leprosy. In: *Immunodiagnosis and Immunorehabilitation for Leprosy, Tuberculosis and Other Chronic Diseases*. 1998: 96–7. (in Russian)
39. Litvinov V. I. The use of immunotropic lycopide in the treatment of tuberculosis. In: *Current Problems of Allergology, Clinical Immunology and Immunopharmacology*. 1998: 299. (in Russian)
40. Serkova N.A., Serkov I.L., Kulakov A.V. The use of a new domestic immunocommodator Licopid to reduce seasonal incidence. *Immunology*. 2000; 3: 62–3. (in Russian)
41. Kiryukhin A.V., Parfenova N.A., Maksimova T.A., Shenogina N.A., L'vov A.V., Chumakova M.M., Andronova T.M. Optimization of treatment for frequently and long-term ill children: immunocorrection with lycopid. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal*. 2001; 5: 27–9. (in Russian)
42. Mayorov R.V., Cheresheva M.V., Verzilin S.D., Chereshev V.A. The effectiveness of the use of immunocorrective drugs for the prevention of respiratory infections and their complications in frequently ill children of primary school age. *Meditinskaya immunologiya*. 2013; 15 (3): 255–62. (in Russian)
43. Chopyak V.V., Potemkina G.A. Comparative characteristics of the effectiveness of the treatment of patients with frequently recurring acute respiratory infections against the background of immunodeficiency disorders using the drug Licopid. *Vrachebnoe delo*. 2013; 2: 106–17. (in Russian)
44. Nikitushkin V.D., Demina G.R., Shleeva M.O., Guryanova S.V., Ruggiero A., Berisio R., Kaprelyants A.S. A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria. *FEBS J*. 2015; 282 (13): 2500–11. DOI: 10.1111/febs.13292.
45. Guryanova S.V., Kozlov I.G., Meshcheryakova E.A., Alekseeva L.G., Andronova T.M. Glucosaminylmuramyl dipeptide normalizes the Th1 / Th2 balance in atopic bronchial asthma. *Immunologiya*. 2009; 5: 305–8. (in Russian)
46. Kozlov I.G., Guryanova S.V., Kolesnikova N.V., Andronova T.M. Muramyl peptides and other agonists of innate immunity receptors in the treatment of allergic diseases. *Rossiyskiy allergologicheskii zhurnal*. 2015; 5: 59–67. (in Russian)
47. Kozlov I.G., Kolesnikova N.V., Voronina E.V., Guryanova S.V., Andronova T.M. Glucosaminylmuramyl dipeptide and other innate immunity receptor agonists in the pathogenetic treatment of allergic diseases. *Allergologiya and immunologiya*. 2013; 14 (4): 281–7. (in Russian)
48. Yagubyan R.S., Sizyagina L.P. the effectiveness of allergen-specific immunotherapy in patients with seasonal allergic rhinitis complicated by secondary immune deficiency syndrome. *Zhurnal fundamental'noy meditsiny i biologii*. 2012; 2: 55–8. (in Russian)
49. Baranova N.I., Molotilov B.A., Kostin E.M. Immunotherapy in patients with bronchial asthma and allergic rhinitis. *Immunopatologiya, allergologiya, infectologiya*. 2008; (4): 32–8. (in Russian)
50. Weber V.R., Moroz B.T. Antiallergic drugs and immunomodulators. In: *Clinical Pharmacology for Dentists*. Sankt Petersburg: Chelovek, 2008.
51. Kevorkov N.N., Bakhmet'ev B.A., Chereshev V.A. The effectiveness of complex immunotherapy for infectious-allergic bronchial asthma (BA). *International Journal of Immunorehabilitation*. 1997; 7: 105–7. (in Russian)
52. Konorev M.R. The use of an immunomodulator of Lycopid when conducting anti-Helicobacter therapy of the first choice. *Immunopatologiya, allergologiya, infectologiya*. 2012; 1: 45–50. (in Russian)
53. Milyutina L.N., Golubev A.O. Experience with the use of Lycopid for the rehabilitation of post-infectious salmonella bacterial carriage in children. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2015; 4: 100–8. (in Russian)
54. Khaitov R.M., Pinegin B.V., Butakov A.A. Immunotherapy of infectious postoperative complications using a new glycopine immunostimulator. *Immunologiya*. 1994; 2: 47–50. (in Russian)
55. Karsonova M. I., Pinegin B.V., Khaitov R.M. Immunocorrective therapy for surgical infection. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 1999; 4 (1): 88–96. (in Russian)
56. Chernetsova L.F., Zotov P.B., Sabirov A.Kh. The use of Lycopid in the treatment of patients with advanced cancer of the gastrointestinal tract. *Meditinskaya panorama*. 2003; 5: 44–5. (in Russian)
57. Makatsaria A.D. Efficacy and safety of glucosaminylmuramyl peptide in the treatment of diseases associated with human papillomavirus: a systematic review. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduktivnaya*. 2019; 13 (2): 132–54. (in Russian)
58. Ivanova, O.N., Argunova, E.F. Study of the characteristics of immunity in children with multiple papillomas. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; (3): 107–9. (in Russian)
59. Pinegin B.V., Minkin G.N. The effect of glucosaminylmuramyl dipeptide on the immune status and clinical condition of patients with cervical lesions of the human papilloma virus. *Immunologiya*. 1994; 3: 46–9. (in Russian)
60. Stolyarova U.V., Khvorostukhina N.F. Comprehensive treatment of cervical papillomavirus infection. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2014; 16 (4): 1456–8. (in Russian)
61. Manukhin I.B., Minkina G.M., Vysotskiy M.M., Kharlova O.G. Comprehensive treatment of patients with local and common condylomatosis of the cervix. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*. 2005; 4 (4): 22–6. (in Russian)
62. Smirnova I.V. Prevention of purulent inflammatory diseases of the uterine appendages using the Licopid immunomodulator. *Immunopatologiya, allergologiya, infectologiya*. 2004; 2: 25–8. (in Russian)
63. Pynzar' M.A., Agikova L.A., Minkin G.N., Andronova T.N., Pinegin B.V. The clinical experience of the immunomodulator lycopid in patients with bacterial vaginosis. *Immunologiya*. 1998; 5: 63–4. (in Russian)
64. Chernetsova L.F., Boltovich A.V., Zorina L.I., Subach E.B. Lycopid and cycloferon in the complex treatment of chlamydial genital infections in women. *Remedium. Privolzh'e*. 2003; 6: 30–1. (in Russian)
65. Tikhomirov A.L., Khol'nov A.I. Immunological aspects and clinical significance of the use of Lycopid in the complex conservative treatment of patients with uterine myoma. *Kachestvo zhizni. Meditsina*. 2008; 2: 45–8. (in Russian)

© Резников Ю.П., 2020

Резников Ю.П.

IX конференция «Здоровье иммунной системы. Преемственность ведения иммунокомпрометированных пациентов на этапах стационар–поликлиника»

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации, 121359, г. Москва, Российская Федерация

Rezников Yu.P.

IX conference «Immune system health. Continuity of immunocompromised patients management at the hospital–polyclinic stages»

Central Clinical Hospital with Polyclinic, Department of Administration of the President of the Russian Federation, 121359, Moscow, Russian Federation

Ежегодная научно-практическая конференция «Здоровье иммунной системы» традиционно состоялась в марте на территории поликлиники № 1 Управления делами Президента Российской Федерации. Она была посвящена славному юбилею – 90-летию патриарха клинической иммунологии нашей страны Рэма Викторовича Петрова. В приветственном письме юбиляру участники конференции, собравшиеся со всех концов страны, отметили его выдающийся вклад в развитие экспериментальной и прикладной иммунологии, создание клинической базы для ведения иммунокомпрометированных пациентов. Лекарственные препараты, в создании которых принимали участие коллективы, возглавляемые Рэмом Викторовичем, широко применяются в практическом здравоохранении. Работа Р.В. Петрова тесно соприкасалась и с кремлевской медициной. В год ее 400-летия он открывал иммунологическую конференцию, посвященную этому событию.

В рамках нынешней конференции участникам была предоставлена возможность ознакомиться с работами ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и ученых ведущих медицинских центров страны в области иммунопатологии.

С чего начинается клиническая иммунология? С общего анализа крови. Его клинической интерпретации с иммунологических позиций была посвящена лекция академика РАН А.Г. Румянцева. Доступный для любого уровня оснащенности медицинского учреждения при квалифицированном выполнении этот анализ сегодня дает куда больше информации о состоянии иммунной системы благодаря новому взгляду на роль форменных элементов крови в защитных механизмах организма. Не осталось ни одного элемента формулы крови, с которым бы не соприкасалась иммунная система. Возьмем, к примеру эритроциты. Из трех видов анемий два (нормоцитарная нормохромная и макроцитарная

гиперхромная) могут возникнуть вследствие иммунной гемолитической или аутоиммунной анемии. Начальное обследование при анемии подразумевает исследование лейкоцитов и тромбоцитов, что позволяет выйти на широкий спектр патологии, в том числе связанной с иммунной системой, например, лейкоцитоз со сдвигом формулы крови влево. Такие заболевания включают острые и хронические инфекции, вызываемые всеми видами агентов (анемия при этом присутствует в 18–95 % случаев), гемобластозы и солидные опухоли (30–77 %), аутоиммунную патологию, хронические реакции «трансплантат против хозяина» (8–71 %), хронические заболевания почек (23–50 %). Повышение ретикулоцитов в общем анализе крови, непрямого билирубина в биохимическом и снижение гаптоглобина являются лабораторными критериями гемолитической анемии.

При положительной пробе Кумбса, наблюдаемой при резус-несовместимости матери и плода, следует исключить патологию, связанную с аутоиммунной гемолитической анемией: первичной, тепловой IgG-обусловленной реакцией, холодовой IgM-обусловленной, пароксизмальной холодовой реакцией, обусловленной IgG. Вторичная аутоиммунная гемолитическая анемия обуславливается злокачественными новообразованиями, иммунодефицитами, инфекциями, например микоплазменной, вирусной, а также лекарственными препаратами. Морфологические изменения эритроцитов при гемолитических анемиях позволяют распознать нозологию ряда заболеваний. Например, сфероциты указывают на наследственный сфероцитоз, иммунную гемолитическую анемию (IgG-антитела), гиперспленизм. Агглютинация эритроцитов благодаря холодовым IgM-агглютинином указывает на иммунную гемолитическую анемию.

Тромбоцитарная компонента анализа крови может отобразить состояние питания эндотелия сосудов, потенциал обеспечения первичного гемостаза, возможно-



Р.В. Петров открывает иммунологическую конференцию, посвященную 400-летию кремлевской медицины (май 2000 г.).



Участники конференции (май 2000 г.)

сти доставки прокоагулянтов к месту повреждения сосуда, их участие в ретракции тромба, противовирусном иммунном ответе, в том числе в презентации антигенов вирусом макрофагам, участии в элиминации бактерий нейтрофильными лейкоцитами.

Было подчеркнуто: важно дифференцировать постинфекционную тромбоцитопению, иммунную тромбоцитопению и ДВС-синдром. Гипертромбоцитоз $>600 \times 10^9/\text{л}$ может быть следствием инфекции на 2–3-й неделе заболевания либо маркером опухоли почки или печени (место образования тромбопоэтина). Функции лейкоцитов весьма обширны. Нейтрофилы обеспечивают поглощение и переваривание микробов, элиминацию продуктов распада клеток, они участвуют в аутовоспалительных процессах (опсонизации, фагоцитозе, секреции хемоаттрактантов, активации системы комплемента). Эозинофилы специализируются на уничтожении гельминтов, простейших, членистоногих и отдельных видов грибов, косвенно свидетельствуют об атопии, иммунодефицитных состояниях (ИДС), коллагенозах, развитии опухолей, являются участниками аутовоспалительных процессов (вырабатывают ИЛ-1–16, ФНО, колониестимулирующие факторы – КСФ и др.). Базофилы участвуют в атопических реакциях, продуцируют гистамин, серотонин, ФНО, ИЛ-5, взаимодействуют с эозинофилами в защите от гельминтов. Нейтрофильные лейкоциты в кровотоке представлены циркулирующим пулом (половина всех нейтрофилов), обновляемым каждые 6–6,5 ч. Отработанные нейтрофилы погибают в тканях, на поверхности кожи и слизистых при выполнении своей функции, время их жизни составляет 24–36 ч. Нейтрофильная недостаточность наблюдается у доношенного ребенка до 3 мес, у недоношенных детей – до 6 мес жизни.

Вирусные инфекции сопровождаются нарушением слияния фагосом с лизосомами, и это лежит в основе вирусно-грибковых и/или вирусно-бактериальных заболеваний. При нейтропении (<1500 кл/мкл) возникает риск бактериемии флорой микробиоты (аутофлорой), отягощаемой сепсисом с некробиозом органов и тканей, эндотоксинемией – шоком – полиорганной недостаточ-

ностью. Нейтрофилез со сдвигом влево демонстрирует переход костно-мозгового пула в кровяной, нейтрофилез со сдвигом вправо – перераспределение маргинального пула нейтрофилов в кровяной. Токсическая зернистость нейтрофилов – эквивалент несостоятельного фагоцитоза, связанного с избытком антигенов. В докладе была представлена классификация нейтропений (Bohn G. и соавт., 2007) и дифференциальный диагноз нейтрофилеза.

Эозинофилия может быть физиологической у новорожденных, а также следствием инвазии паразитами, аллергии (бронхиальная астма, кожная аллергия и т.д.), заболеваний кожи и подкожной клетчатки (экзема, псориаз, ихтиоз и т.д.), заболеваний соединительной ткани (ювенильный ревматоидный артрит, системная красная волчанка и др.), лейкозов и лимфом, гиперэозинофильного синдрома. Касаясь лимфоцитов как полпредов специфического иммунитета, автор отметил роль Т-лимфоцитов в продукции соматомединов, обеспечивающих рост и дифференцировку клеток и тканей ребенка. Эти клетки защищают организм от вне- и внутриклеточных патогенов, взаимодействуют с макрофагами (через ИЛ-1), В-клетками (контроль антителообразования), осуществляют противоопухолевый надзор, участвуют в реакциях гиперчувствительности замедленного типа, отторжения и др.

Касаясь вопросов количественных и качественных изменений лимфоцитов крови, автор отметил «омоложение» лимфоцитарно-гранулоцитарного перекреста, который теперь происходит на 4-й день жизни ребенка и в 4 года.

Снижение числа лимфоцитов <500 кл/мкл – маркер ИДС. «Широкоплазменные» лимфоциты как ответ на инфекции В-клеток (вирусы Эпштейна–Барр и др.) – это бласт-трансформированные Т-лимфоциты. Моноциты объединены в одну группу клеток с макрофагами. Функции моноцитов/макрофагов – представлять антигены Т-лимфоцитам и включать их в пролиферацию и дифференцировку через ИЛ-1. Они являются индукторами поступления нейтрофилов из депо, осуществляют фагоцитоз и переваривание микроорганизмов и детрита, синтезируют и секретируют около 40 биоактив-

ных веществ и медиаторов воспаления, обеспечивают противоопухолевую цитотоксичность, поддерживают экстрацеллюлярное микроокружение. Моноцитоз ($>0,8 \times 10^9$ кл/л) наблюдается при нейтропениях, гистиоцитарных заболеваниях, сопровождающихся развитием гранулем, заболеваниях соединительной ткани и гемопэтических опухолях.

Моноцитопения ($<0,4 \times 10^9$ кл/л) наблюдается при лечении глюкокортикоидами, инфекциях, протекающих с эндотоксинемией. Особые случаи – инфекции моноцитов/макрофагов (микобактерии, сальмонеллы, ряд вирусов).

И, наконец, скорость оседания эритроцитов. К факторам, увеличивающим ее величину, относятся фибриноген, иммуноглобулины, гаптоглобин, липиды, антиэритроцитарные антитела, эритроцитопении, алкалоз. С другой стороны, к факторам, уменьшающим ее величину, относятся желчные кислоты и пигменты, ацидоз, эритроцитоз, анизоцитоз, серповидность и сфероцитоз эритроцитов. Итак, в схеме нормального иммунного ответа поведение клеток крови можно представить следующим образом: после воздействия антигена в lag-фазу (1-я неделя) формируются нейтрофилез со сдвигом влево и тромбоцитопения. На 2-й неделе (фаза недостаточности надпочечников) формируются лимфоцитоз и нейтропения. На 3-й неделе (фаза астении) образуются плазматические клетки, развиваются моноцитоз и гипертромбоцитоз. На 4–24-й неделях развивается и завершается иммунный ответ. При аномальном иммунном ответе на 1-й неделе возможен инфекционный токсикоз, шок. При первом варианте отмечается гиперлейкоцитоз со сдвигом влево и токсической зернистостью нейтрофилов, во втором – лимфоцитоз и тромбоцитопения. В фазе вторичной бактериальной инфекции (2-я неделя) при первом варианте наблюдается гиперлейкоцитоз со сдвигом влево, при втором формируются плазматические клетки. На 3-й неделе типичный ответ отсутствует, и в результате на 4–48-й неделях происходит хронизация процесса. Таким образом, общий анализ крови является входными воротами в лабиринт по пути к установлению диагноза, где исследователю предоставляется вектор движения к установлению истины.

Лекция профессора Ф.Ю. Гариба была посвящена иммунной толерантности и механизмам иммунопатологии. Иммунная толерантность – это активный процесс поддержания неотвечаемости иммунной системы по отношению к собственным и чужеродным молекулам. Понятие толерантности было охарактеризовано П. Медавара и М. Бернетом, которые в 1960 г. получили Нобелевскую премию за открытие этого явления. П. Медвар с коллегами доказали, что в процессе эмбриогенеза формируется ауто толерантность, которая постоянно поддерживается в период онтогенеза и сохраняется всю жизнь (см. таблицу). После рождения человека в течение первых суток формируется толерантность, но уже по отношению к тем микробам, которые попадают в организм человека. Это микробы очень ценные – они создают микробиом кишечника и других участков тела

человека. Как правило, кишечник новорожденного заселяется материнскими микроорганизмами. М. Бернет предположил, что на каждом новообразованном Т- или В-лимфоците должны располагаться антиген-связывающие рецепторы только одной специфичности. Это подразумевало, что лимфоцитов с рецептором к конкретной антигенной детерминанте исходно очень мало – примерно один лимфоцит на миллион. Поэтому, когда в организм поступит антиген, среди миллиардов лимфоцитов необходимо найти только те, которые будут способны соединиться с чужими антигенными детерминантами и клонировать их до сотни тысяч нужных для иммунного ответа клеток. Теория М. Бернета, которой мы сейчас пользуемся, получила название клонально-селекционной. Важно отметить, что для дифференцировки Т- и В-клеток с несметным разнообразием специфичностей рецепторов используются генетические рекомбинации, которые случайным путем формируют генетические конструкции, контролируемые образование лимфоцитов с рецепторами, направленными против «чужого». Эти лимфоциты полезны, а лимфоциты с рецепторами к аутоантигенам потенциально опасны. Для того чтобы можно было узнать и удалить такие аутореактивные лимфоциты, существуют специальные механизмы селекции, отбора и уничтожения таких клеток в центральных органах иммунной системы: в тимусе и в костном мозге. Это механизмы центральной толерантности, когда в центральных иммунных органах обнаруживаются аутореактивные лимфоциты, которые удаляются путем апоптоза, либо рецептор на В-лимфоците редактируется и клетка теряет аутореактивность. Много лимфоцитов с рецепторами к аутоантигенам проникают на периферию и рециркулируют, поэтому толерантность поддерживается и на периферии. Еще один очень важный фактор, который сдерживает развитие аутоиммунных процессов – регуляторные Т-клетки. Это специализированные Т-лимфоциты, которые обладают способностью подавлять иммунные реакции. Мы хорошо понимаем, что одни лимфоциты (хелперы) помогают иммунному ответу, а другие – подавляют иммунный ответ. Такая регуляция необходима, для того чтобы иммунный ответ имел оптимальную силу, не превышал нужных границ и не стал опасным для организма.

В основе патогенеза аутоиммунных заболеваний лежит срыв иммунной ауто толерантности, что позволяет иммунной системе атаковать собственные ткани. До 7 % населения в развитых странах страдают аутоиммунными расстройствами. Причем многие подобные заболевания поддерживают хроническое воспаление, они неуклонно рецидивируют и в итоге приводят либо к смерти, либо к глубокой инвалидности. Сейчас появились новые лечебные подходы, например, таргетная, то есть целевая, терапия, при которой применяются моноклональные антитела, способные подавлять воспалительный процесс путем нейтрализации ключевых цитокинов (ФНО, ИЛ-1, ИЛ-6 и др.). Иммунопатогенез лежит в основе многих патологических процессов, причем он развивается по циклу: хроническая инфекция →

Иммунная толерантность (Гариб Ф.Ю., 2019)

естественная	Антиген-специфическая		Антиген-неспецифическая
		индуцированная	
<ul style="list-style-type: none"> • Толерантность к своим молекулам в процессе эмбриогенеза и в последующем путем удаления аутореактивных клеток. • Толерантность матери к плоду при беременности. • Толерантность к своему микробиому 	<ul style="list-style-type: none"> • Введение антигена в эмбрион или в первые сутки после рождения. • Опухолевый рост. • Персистенция инфекции (герпес-вирус, ЦМВ). • Введение высокой или низкой дозы антигена. • Оральное введение антигена. • Введение антигена в слабоваскуляризованные и иммунопривилегированные ткани (семенники, мозг, глаз и др.). • Пересадка трансплантата, близкого реципиенту по антигенам гистосовместимости. • Мимикрирующие антигены патогенов 	<ul style="list-style-type: none"> • Неонатальная тимэктомия. • Нокаут генов. • Врожденные грубые дефекты иммунной системы. • Приобретенные поражения иммунной системы (инфекционные, радиационные, токсические, лекарственные и др.). • Удаление лимфоидных органов 	

хроническое воспаление → срыв ауто толерантности → аутоиммунная реакция → нарушение иммунорегуляции → формирование клеток иммунной памяти → иммунопатогенез → повреждение тканей → хроническое воспаление (заканчивается фиброзом, разрушением костей или тканей, замещением тканей фибробластами и т.д.). Существуют четыре типа иммунопатологических реакций: в трех из них участвуют антитела, в одной – Т-лимфоциты и макрофаги. Представления о классических формах иммунопатогенеза были сформулированы в 1963 г., но остаются верны до сегодняшнего дня.

П. Джелл и Р. Кумбс предложили классификацию гиперчувствительности, согласно которой иммунные механизмы развития патологических процессов укладываются в четыре типа:

1. Анафилактическая гиперчувствительность немедленного типа.
2. Антитело-зависимая цитотоксичность.
3. Иммунокомплексная гиперчувствительность.
4. Клеточная гиперчувствительность замедленного типа.

Важно помнить, что воспаление лежит в основе многих, почти всех заболеваний человека. Интересно, что ключевую роль в поддержании хронических воспалительных процессов играют клетки иммунной памяти.

Доклад доктор медицинских наук Е.А. Латышевой и профессора Т.В. Латышевой был посвящен первичным иммунодефицитам (ПИД) взрослых. Авторы коснулись истории развития этой проблемы в нашей стране, начиная с описания первого клинического случая ПИД у ребенка (Балашова И.И., 1956 г.) и создания регистра ПИД у взрослых (1995 г.). До 2000 г. проблема ПИД считалась сугубо педиатрической. В настоящее время 30–40 % пациентов с ПИД старше 18 лет. В регистре РФ числится 2431 такой пациент, а в регистре ESID – 19 355 пациентов. Наиболее частыми формами ПИД относительно благоприятного течения, зарегистрированными в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, считаются ПИД с преимущественным нарушением синтеза антител (~60 %, и среди них >70 % составляет общая вариабельная иммунная недостаточность, ОВИН). У 40 % взрослых больных ПИД сочетается с наследственными ангиоотеками (НАО).

Количество взрослых пациентов с ПИД за прошедшие 13 лет возросло в 10,5 раз, причем у 60 % пациентов диагноз был поставлен в возрасте старше 18 лет. Клинически ПИД прежде всего проявляется инфекциями. Среди неинфекционных проявлений необходимо отметить избыточную лимфопрлиферацию, аутоиммунные, опухолевые, эндокринные, аллергические заболевания, поражение нервной системы. Примерно у 30 % пациентов ПИД дебютируют неинфекционными заболеваниями (аутоиммунные, сопровождаемые прежде всего цитопениями, лимфопрлиферативными заболеваниями, гранулематозными поражениями легких, диарейным синдромом, рецидивирующими лихорадками, атипичными экземами, рефрактерными к стандартным схемам терапии). Инфекционный синдром у детей чаще тяжелый и ранозначающийся, а у взрослых – нетяжелый со стертыми проявлениями.

Гранулематозно-интерстициальная болезнь, как правило, предшествует постановке диагноза ОВИН. Особенностью гранулем является их расположение преимущественно в нижних и средних отделах легких. Они имеют более крупные размеры, чем при саркоидозе, и расположены хаотично. Около 50 % гранулем имеют бронхоэктазы и другие признаки частых инфекций. В 88,5 % случаев выявляется спленомегалия, ни в одном случае не наблюдалось спонтанной ремиссии.

Что первично: лимфома или ПИД? Авторы работают над этим вопросом. Ими разработан алгоритм постановки диагноза, в который включены осмотр, анализ наследственности, анамнез жизни и заболевания, скрининговое обследование, включающее общий анализ крови, определение общего белка, его фракционирование с выделением γ -фракции, исследование иммуноглобулинов – TREC и KREC. Такой спектр исследований доступен и может быть широко применим. Каковы критерии постановки диагноза ОВИН? Согласно руководству ESID-2014, диагноз формируется по следующим составляющим:

I. Наличие одного или более критериев: повышенная подверженность инфекциям, аутоиммунные проявления, гранулематозная болезнь, необъяснимая поликлональная лимфопрлиферация, ПИД с нарушением синтеза антител у членов семьи.

II. Выраженное снижение уровней IgG и IgA со снижением уровня IgM или без него.

III. Один или более из следующих критериев: неадекватный ответ на вакцинацию (и/или отсутствие изогемагглютининов), малое количество переключенных В-клеток памяти (<70 % от возрастной нормы).

IV. Исключение гипогаммаглобулинемии вторичного генеза.

V. Возраст старше 4 лет (клинические симптомы могут дебютировать раньше).

VI. Отсутствие признаков глубокого нарушения Т-клеточного звена иммунитета (наличие не более одного из трех критериев): CD4⁺ кл/мкл: 2–6 лет – <300, 6–12 лет – <250, >12 лет – <200; % наивных CD4⁺: 2–6 лет – <25 %, 6–16 лет – <20 %, от 16 лет – <10 %; Т-клеточная пролиферация отсутствует.

Лечение зависит от формы ПИД и включает коррекцию генетического дефекта (трансплантация, генная инженерия), таргетную терапию, контроль инфекционных осложнений, коррекцию сопутствующей патологии (симптоматическая терапия). Заместительная терапия – основа лечения для большинства ПИД. В зависимости от формы ПИД она может быть постоянной или эпизодической. Последняя тенденция – уход от шаблонных доз IgG – использование внутривенных иммуноглобулинов (ВВИГ) *quantum satis*.

Базисная терапия включает применение ВВИГ в дозе 0,4–0,6 г/кг в 3–4 недели. Целевой претрансфузионный уровень составляет 7–8 г/л. Помимо традиционных 5 % препаратов IgG для внутривенного введения, используют 10 % препараты, на подходе применение препаратов с содержанием ВВИГ 16,5 %. Рассматриваются возможности подкожного введения иммуноглобулинов. В лечении аутоиммунных, аутовоспалительных и лимфопролиферативных проявлений ПИД используют системные глюкокортикостероиды (ГКС), буденофальк (для гастроэнтеральных форм), иммунодепрессанты и препараты на основе моноклональных антител для нейтрализации медиаторов иммунных реакций.

Одной из главных задач в ведении больных с ПИД в настоящее время является своевременная постановка диагноза, призванная предупреждать развитие осложнений, инвалидизации и ранней смертности. Увеличение затрат на лечение этих больных должно способствовать проведению им адекватной терапии.

В докладе кандидата медицинских наук И.А. Корсунского было подчеркнуто, что из 300 вариантов ПИД, объединенных в 9 групп (комбинированные Т- и В-клеточные иммунодефициты, четко определенные синдромы с иммунодефицитами, дефицит антителообразования, заболевания с иммунной дисрегуляцией, врожденные пороки фагоцитов, дефекты врожденного иммунитета, аутовоспалительные заболевания, дефекты комплемента и фенокопии ПИДС, вызванные соматическими мутациями). Большинство из них – дефекты гуморального иммунитета.

Применяемые в настоящее время алгоритмы выявления пациентов с иммунодефицитными состояниями

малоэффективны, поскольку вслед за данными анамнеза и общего анализа крови следуют малодоступные, сложные в проведении и интерпретации лабораторные исследования. Иными словами, направление пациента на консультацию специалиста аллерголога-иммунолога во многом зависит от опыта врача общей практики. Он, как правило, не владеет критериями лабораторной идентификации ПИДС. Популяционный скрининг новорожденных – существенный шаг в решении этой проблемы. Оценка недавно открытых и уже зарекомендовавших себя в практике маркеров наивных Т- и В-лимфоцитов – TREC и KREC – доказала их актуальность, так как позволяет выявлять не только первичные, но и вторичные иммунодефициты, а также заболевания с идиопатической лимфопенией. Есть надежда, что сроки до назначения адекватной иммунотерапии у таких пациентов будут сокращаться и это скажется на прогнозе течения заболевания.

Пилотный скрининг ПИД в Московской области выявил 147 случаев снижения уровня маркеров наивных Т- и В-лимфоцитов среди 17 476 новорожденных. Все они, за исключением 3 детей, были доношенными. Ни один обследуемый не обладал экстремально низкой массой тела. Из 16 пациентов с существенным снижением концентрации наивных Т- и/или В-лимфоцитов 3 ребенка погибли в первые 2 недели жизни, 1 умер на 2-м месяце жизни от тяжелых бактериальных инфекций.

Анализ уровня маркеров наивных Т- и В-лимфоцитов также может использоваться для избирательного скрининга пациентов из групп риска по иммунодефицитным состояниям. Расчеты показывают, что результат анализа TREC и KREC является отличным прогностическим показателем при углубленном иммунологическом обследовании. Кроме того, положительно зарекомендовал себя так называемый расчетный глобулин – результат вычитания содержания альбумина из общего белка. При его значении <20 у пациента с высокой долей вероятности можно заподозрить гипогаммаглобулинемию. Таким образом, предлагаемый алгоритм выявления пациентов с иммунодефицитными состояниями может более объективно охарактеризовать группу риска, куда входят недоношенные младенцы, пациенты с идиопатической лимфопенией, пациенты, получающие иммуносупрессивную и биотерапию, пациенты с септическими состояниями, пациенты, перенесшие массивную кровопотерю или трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, ВИЧ-инфицированные пациенты и пациенты с туберкулезом. Анализ уровня маркеров наивных Т- и В-лимфоцитов (TREC и KREC) зарегистрирован и разрешен для применения в клинической практике методом.

Доктор медицинских наук А.Н. Пампура поделился опытом ведения пациентов с НАО. С ними приходится сталкиваться в педиатрической практике, однако педиатры мало знакомы с этой патологией иммунной системы. Согласно литературным данным, распространенность НАО составляет 1–2 на 100 тысяч населения и не зависит ни от гендерной принадлежности, ни от

расы. Необходимо отметить, что ангиоотеки, индуцируемые блокаторами ангиотензин-превращающего фермента, у детей встречаются крайне редко.

НАО – это генетическое заболевание, которое представлено в Федеральном регистре орфанных заболеваний как дефект системы комплемента (код МКБ D 84.1). В 2017 г. рабочей группой Всемирной аллергологической организации (World Allergy Organization, WAO) по диагностике и лечению НАО была предложена классификация, основанная на наличии дефицита/дефекта С1-ингибитора (I и II тип) и НАО с нормальным уровнем С1-ингибитора. Для НАО в большинстве случаев характерен аутосомно-доминантный тип наследования. На сегодняшний день идентифицировано более 450 мутаций гена *SERPING1* в 11-й хромосоме, который кодирует С1-ингибитор. Примерно у 25 % пациентов заболевание вызвано мутацией *de novo*. С этими мутациями связано возникновение НАО I и II типов. НАО с нормальным уровнем С1-ингибитора вызван мутациями гена фактора свертывания XII (медиатором является брадикинин) или мутациями генов ангиопоэтина-1 и плазминогена. Медиаторы последних подтипов НАО пока неизвестны. Ингибитор С1-эстеразы является блокатором сериновой протеазы и протеаз контактной системы (плазменный калликреин и фактор свертывания XII), а также слабым ингибитором фибринолитической протеазы плазмина. Механизм развития отеков при НАО обусловлен избыточной активацией комплемента и фактора Хагемана (фактора XII) с образованием брадикинина и С2-кинина, повышающих проницаемость сосудов. Таким образом, первичным медиатором отека при НАО I и II типов является брадикинин.

Повышенная проницаемость сосудов, вызванная высвобождением брадикинина при ангиоотеке, запускается опосредовано через В2-рецептор брадикинина. Несмотря на то что дефект гена *SERPING1* имеется уже при рождении, симптомы НАО I и II типов могут дебютировать в любом возрасте. В большинстве случаев симптомы дебютируют в течение первых двух десятилетий жизни. Наиболее ранними и самыми распространенными проявлениями НАО у детей являются подкожный отек и абдоминальные симптомы. У детей раннего возраста в силу анатомо-физиологических особенностей строения гортани может быстро возникнуть асфиксия. При диагностическом поиске следует обращать внимание на следующие ключевые аспекты: рецидивирующие ангионевротические отеки, отсутствие/наличие проявлений крапивницы, отсутствие/наличие эффекта от применения антигистаминных препаратов и ГКС. Кроме того, необходимо уточнить наличие отягощенного семейного анамнеза, эпизоды рецидивирующих абдоминальных атак, возникновение незудящих отеков различной локализации, наличие продромальных признаков перед возникновением атак (при подозрении на НАО). У детей в качестве продромального признака НАО в 42–58 % случаев встречается маргинальная эритема, которая часто принимается за крапивницу. Терапия НАО у детей и у взрослых включает терапию

обострений, предпроцедурную и долгосрочную профилактику. В настоящее время одобренными препаратами для терапии тяжелых и жизнеугрожающих обострений НАО у детей на территории РФ являются икатибант и концентрат ингибитора С1-эстеразы.

Онкологический раздел программы был представлен уникальным наблюдением сочетания IgG4-связанной болезни (IgG4-СБ) с раком желудка (профессор Ю.П. Грибунов, кандидат медицинских наук И.Н. Шестакова, профессор И.В. Матвейчук). Это аутоиммунное воспалительно-склерозирующее заболевание с формированием опухолеподобных поражений различных органов и тканей. Уровень IgG4 при этом достигает рекордных величин, которые теоретически могли бы конкурировать лишь с IgG4-миеломой, однако здесь иммуноглобулин поликлональный. Диагноз основывается на обнаружении как минимум двух из трех гистологических критериев (Международный консенсус, Бостон, 2012 г.): интенсивной лимфоплазмноклеточной инфильтрации, фиброза, хотя бы частично имеющего вихреобразный (муаровый) рисунок, и облитерирующего флебита. Количество IgG4⁺-клеток в инфильтратах должно быть от >10 до >50 в одном поле зрения (× 400), а соотношение IgG4⁺/IgG⁺-плазматических клеток должно превышать 40 %. Постановка клинического диагноза IgG4-СБ возможна только на основании сочетания характерной клинической манифестации (наличие объемного образования в наиболее часто поражаемых органах и тканях), указанных морфологических признаков и положительного ответа на терапию глюкокортикоидами. Так, подавляющее число случаев этого заболевания, встречающихся в хирургических клиниках, – это аутоиммунный панкреатит с поражением внепеченочных желчных протоков и желчного пузыря, в терапевтических клиниках – поражение орбиты и слюнных желез (в ревматологической клинике) или лимфаденопатическая форма болезни (в гематологической клинике).

Вместе с тем приходится сталкиваться и с более редкими проявлениями IgG4-СБ: опухолеподобными поражениями твердой мозговой оболочки головного и спинного мозга, кожи, глаза, щитовидной или предстательной железы и уретры, молочной железы, аорты, вилочковой железы, мягких тканей шеи и средостения. Весьма типичный для IgG4-СБ забрюшинный фиброз может остаться недиагностированным, так как его клиническая манифестация наступает только при сдавлении мочеточников. Особого внимания заслуживает проблема ассоциации IgG4-СБ и злокачественных опухолей. Общность некоторых ключевых звеньев патогенеза (запуск гиперпродукции ИЛ-10, Трег-цитокинов) позволяет полагать, что злокачественная опухоль развивается либо на фоне предсуществующей IgG4-СБ, либо параллельно и даже в одном очаге. Представленное клиническое наблюдение подтверждает это предположение.

Манифестацией заболевания у мужчины 70 лет стало объемное образование в подчелюстной области, появившееся 1,5 года назад. Морфологический анализ

биоптата идентифицировал IgG4-связанный сиалоаденит. Лучевое исследование выявило тотальное поражение желудка, перигастральных лимфатических узлов и желчного пузыря. В эндоскопическом биоптате желудка обнаружен перстневидно-клеточный рак. Пациенту выполнена гастрэктомия с лимфадиссекцией. При гистологическом исследовании операционного материала установлено, что рак желудка был ограничен пределами собственной пластинки. Обширное поражение стенки желудка, пищевода, желчного пузыря и перигастральных лимфатических узлов обусловлено IgG4-СБ. До настоящего времени пациент наблюдается амбулаторно в клинике.

В работе профессора И.О. Иваникова и соавт. проанализированы нормальное содержание IgE в крови у здоровых лиц в возрасте 0–75 лет, а также в клинических ситуациях, сопровождаемых его повышением от 1000 до 64 000 кЕ/л. Уникальность IgE заключается в том, что это иммуноглобулин «быстрого реагирования», не нуждающийся в активации важнейшего эффекторного звена гуморального иммунитета – комплекса. Отсюда немедленные реакции на внедрившийся агент (аллерген) и последующее включение механизмов его элиминации. Возрастные нормы содержания IgE в крови, установленные в 1970-е гг., сегодня имеют лишь историческое значение. Авторами было установ-

лено, что уровень IgE у здоровых индивидуумов максимального значения достигает в 14–16 лет (ср + 2g = 386 кЕ/л), при этом выработка аллерген-специфических IgE в очень высокой концентрации может происходить на фоне всего 2,4 кЕ/л общего IgE.

С какой патологией сочетаются сверхвысокие уровни IgE? Согласно данным авторов, уровни IgE >15 000 кЕ/л при незлокачественных заболеваниях могли сопровождать бронхиальную астму, нейродермит, атопический дерматит, аллергию на морепродукты, хронический обструктивный бронхит, поллиноз, острую пневмонию; среди злокачественных заболеваний такой уровень наблюдали при хроническом лимфолейкозе, лимфомах, лимфосаркоме. Последняя группа по частоте встречаемости сверхвысоких уровней IgE конкурирует с гипер-IgE-синдромом.

Профессор М.Н. Ярцев показал, что этот иммунодефицит сопровождается полиорганной патологией, а не только холодными абсцессами, хорошо поддающимися лечению сульфаниламидными препаратами. По прогнозу течения заболевания он по сравнению с ОВИН куда более неблагоприятен и остается лишь радоваться тому, что он встречается значительно реже.

Участники конференции направили академику Рэму Викторовичу Петрову поздравление со славным юбилеем.

Дорогой Рэм Викторович!

Мы, участники IX конференции «Здоровье иммунной системы», накануне вашего славного юбилея шлем сердечный привет и пожелания крепкого здоровья. Среди нас есть тот, кто еще в начале 1970-х гг. ездил на Ваш первый курс лекций, который Вы читали в 55-й больнице. Тогда на кафедре госпитальной педиатрии 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова были подготовлены первые педиатры-иммунологи – Л.Н. Хахалин, Л.А. Гомес, М.Н. Ярцев, перешедшие работать в отделение иммунодефицитов в созданном Вами Институте иммунологии. Всех нас объединила иммунология, остающаяся маяком в нашей жизни. Мы гордимся тем, что являемся вашими современниками!

Академик Рэм Викторович Петров

К 90-летию со дня рождения



Свой славный юбилей отмечает Рэм Викторович Петров – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН.

Р.В. Петров – выдающийся иммунолог нашей страны. С его именем связано развитие фундаментальных и прикладных проблем современной иммунологии, аллергологии и иммуногенетики: радиационная иммунология, генетический контроль иммунного ответа, молекулярно-клеточные механизмы его регуляции, создание концепции и методологии оценки иммунного статуса, разработка принципов конструирования вакцин нового поколения с повышенными иммунизирующими свойствами.

Приоритетные исследования Р.В. Петрова (1963–1973 гг.) были посвящены проблемам иммуногенетики, клеточных взаимодействий, регуляции иммунного ответа. Им совместно с сотрудниками впервые были выявлены гены иммунного ответа, контролирующие продукцию антител к микробным антигенам, доказана реализация генетического контроля иммунного ответа на уровне клеточных популяций, изучены этапы иммуногенеза, на которых реализуется генетический контроль. Доказано, что межклеточные взаимодействия, регулирующие иммунный ответ, осуществляются не только в его латентную фазу, но и в продуктивный период антителогенеза. Р.В. Петров – автор открытия эффектов взаимодействия центральных элементов системы кроветворения: кроветворных стволовых клеток с центральными клетками системы иммунитета – лимфоцитами. Изучение механизмов этого феномена привело к выявлению клеток иммунной системы, регулирующих кроветворение, и к открытию регуляторных пептидов костного мозга – миелопептидов. На основе костномозговых миелопептидов созданы лекарственные препараты – миелопид, бивален, серамил. Миелопид вошел в клиническую и ветеринарную практику.

В лабораторных исследованиях, а также в реальных условиях влияния излучений при атомных взрывах на Семипалатинском полигоне (1955–1956 гг.) изучены основные закономерности действия ионизирующей радиации на иммунитет. Материалы вошли в доклад научного Совета ООН «Действие радиации на иммунную систему» (1972).

В конце 1970-х – начале 1980-х гг. Р.В. Петровым, Р.М. Хаитовым и соавт. были опубликованы первые работы о влиянии синтетических полимерных соединений на функции иммунокомпетентных клеток. Разработка этой проблемы привела к созданию технологии конструирования вакцин нового поколения с повышенными иммунизирующими свойствами – конъюгированных полимер-субъединичных вакцин. В 1997 г. по инициативе и под руководством Р.В. Петрова была создана целевая межведомственная научно-техническая программа «Вакцины нового поколения и диагностические системы будущего». Одной из первых вакцин нового поколения, созданных Р.В. Петровым, Р.М. Хаитовым и соавт. для массовой вакцинации населения, стала тривалентная полимер-субъединичная гриппозная нановакцина Гриппол®, состоящая из очищенных субъединичных эпитопов (гемагглютинин и нейраминидаза) актуальных штаммов вирусов гриппа А и В, конъюгированных с синтетическим иммуностимулятором. В рамках разработанной программы в Институте иммунологии был создан также ряд эффективных иммунодиагностикомов и иммуномодулирующих лечебных препаратов, разработаны технологии получения вакцин нового поколения к возбудителям наиболее социально значимых инфекций.

В середине 1970-х гг. по инициативе и под руководством Р.В. Петрова разворачиваются работы по оценке иммунного статуса человека, динамическому слежению за его состоянием у больших контингентов

взрослого и детского населения различных регионов, изучению влияния на него экологически неблагоприятных факторов. Созданная методология была внедрена в практическое здравоохранение, сформирована сеть региональных центров и лабораторий клинической иммунологии.

Результаты научной деятельности академика Р.В. Петрова обобщены более чем в 500 научных работах, в том числе в 16 монографиях, учебнике «Иммунология», открытиях и изобретениях. Более 60 научных трудов Р.В. Петрова, включая 8 монографий, опубликованы в США, Англии, Франции, Японии и в других странах.

Р.В. Петров внес значительный вклад в подготовку высококвалифицированных кадров, в преподавание и пропаганду иммунологии в России и СНГ. Им подготовлено более 80 докторов и кандидатов наук. Преподавание иммунологии как самостоятельной научной дисциплины Рэм Викторович начал в 1965 г. в Новосибирском государственном университете. В 1970 г. он организовал курс, а в 1974 г. – первую кафедру иммунологии в нашей стране на медико-биологическом факультете 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова (ныне ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России). Кафедрой он заведовал более 20 лет. Им разработана программа преподавания иммунологии, создан первый в СССР и России учебник иммунологии для вузов. По инициативе Р.В. Петрова в 1979 г. в Москве создается первый в стране Институт иммунологии (ныне – ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА), директором которого Рэм Викторович был 5 лет, затем его избрали в руководство АН СССР. Несколько сроков Р.В. Петров был вице-президентом академии наук. После Р.В. Петрова Институтом иммунологии в течение почти 30 лет руководил его ученик академик Р.М. Хаитов (в настоящее время – научный руководитель института). В 1983 г. организовано Всесоюзное научное общество иммунологов (президент – Р.В. Петров, первый вице-президент – Р.М. Хаитов), ныне Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов (почетный президент – Р.В. Петров, президент – Р.М. Хаитов). Под эгидой Ассоциации на протяжении многих лет ведущие ученые и клиницисты страны делятся достижениями в области фундаментальной и прикладной иммунологии на ежегодных конгрессах и конференциях.

В 1980 г. был основан журнал «Иммунология», который стал первым в нашей стране специализированным изданием, посвященным иммунологической науке (главный редактор по настоящее время – академик РАН Р.М. Хаитов). С момента создания журнала Р.В. Петров – постоянный член редколлегии. В настоящее время журнал является ведущим иммуно-

логическим журналом России, соответствует мировому уровню, индексируется в международных системах цитирования.

Большое внимание Р.В. Петров уделял популяризации иммунологии. Рэм Викторович – член Союза писателей СССР, затем РФ, автор многих научно-популярных и научно-художественных книг и статей, научно-популярных фильмов. Его книги «Сфинксы XX века» (1967, 1971), «Иммунология от Пастера до наших дней» (1968), «Беседы о новой иммунологии» (1976), «Я или не Я» (1983, 1987) и другие изданы на 15 языках мира.

Рэм Викторович Петров ведет огромную организаторскую, общественную и международную работу. Он – член Правления Международного союза иммунологических обществ (IUIS) (1989), вице-председатель постоянного комитета ЮНЕСКО по молекулярной и клеточной биологии (1989), сопредседатель Комитета по биоэтике при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО (1995). Рэм Викторович принимает активное участие в деятельности редколлегии ряда зарубежных и отечественных специализированных журналов. Его вклад в развитие иммунологии и заслуги перед ней отмечены избранием действительным членом Всемирной академии искусств и науки (США), Вашингтонской и Норвежской академий наук. Р.В. Петров – доктор Honoris causa Бар-Иланского университета (Израиль), Мадридского политехнического университета, Воронежского государственного медицинского университета и Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина. Он был действительным членом РАН, РАМН и РАСХН одновременно.

Р.В. Петров награжден золотой медалью имени И.И. Мечникова АН СССР (1987), золотой медалью Международного общества трансплантологов. В 1997 г. Р.В. Петрову присуждена премия Правительства РФ в области науки и техники, в 2001 г. – Государственная премия РФ в области науки и техники. В 2012 г. академик Р.В. Петров был удостоен Государственной премии в области науки и технологий «За выдающиеся достижения в научном и практическом развитии отечественной иммунологии».

Академик Р.В. Петров – Герой Социалистического труда, он награжден орденами Ленина, Октябрьской Революции и «За заслуги перед Отечеством» III степени, медалями «За трудовую доблесть», «За доблестный труд».

Редколлегия журнала «Иммунология» и коллектив Института иммунологии сердечно поздравляют Рэма Викторовича Петрова с юбилеем, желают ему крепкого здоровья и творческих успехов.