

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



И.И. Мечников

Том 40
2019

1

Volume 40, Number 1, 2019

ИММУНОЛОГИЯ

Научно-практический рецензируемый журнал

Основан в 1980 г.

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

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

Главный редактор
академик РАН Хаитов Рахим Мусаевич



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Акдис Ч., MD, профессор, Давос, Швейцария
Агаче И., MD, профессор, Брасов, Румыния
Атауллаханов Р.И., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Болдырева М.Н., доктор мед. наук, Москва, Россия
Валента Р., MD, профессор, Вена, Австрия
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
Ильина Н.И., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Кадагидзе З.Г., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Карамов Э.В., доктор биол. наук, профессор, Москва, Россия
Караулов А.В., академик РАН, доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Медуницын Н.В., академик РАН, доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Мураро А., MD, профессор, Падуя, Италия
Николаева И.А., доктор биол. наук, Москва, Россия
Пащенко М.В., доктор мед. наук, Москва, Россия
Петров Р.В., академик РАН, доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Пинегин Б.В., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Резников Ю.П., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Симбирцев А.С., член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор, Санкт-Петербург, Россия
Филатов А.В., доктор биол. наук, профессор, Москва, Россия
Хаитов М.Р., член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Научно-практический рецензируемый журнал
«Иммунология»
Том 40, № 1, 2019

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
№ 0110435 от 19.03.1993

Периодичность: 6 номеров в год.

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

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

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

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

Заведующая редакцией:
Гаврикова Галина Ивановна,
immunol@idm.msk.ru
(направлять корреспонденцию)

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

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

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

Подписано в печать 15.03.2019.
Тираж 3000 экземпляров.
Формат 60 × 90 1/8.
Печать офсетная. Печ. л. 11.

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

Все права защищены.

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

Russian Academy of Sciences

National Research Center –

Institute of Immunology

Federal Medical-Biological Agency of Russia

IMMUNOLOGIYA

Scientific-Practical Peer Reviewed Journal

Since 1980

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

Editor-in-Chief

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

Immunologiya

Volume 40, N 1, 2019

Mass media registration certificate
N 0110435 from 19.03.1993

Periodicity: 6 issues per year.

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

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

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

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

Head of the editorial office:

Gavrikova Galina,
immunol@idm.msk.ru
(send correspondence)

Publisher

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

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

www.geotar.ru

Circulation of 3000 copies.

Format 60 × 90 1/8.

Offset printing 11 sh.

All rights reserved.

© GEOTAR-Media Publishing Group, 2019.

EDITORIAL BOARD

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

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

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

Boldyreva Margarita, MD, PhD, Moscow, Russia

Filatov Alexander, PhD, prof., Moscow, Russia

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

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

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

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

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

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

Karamov Edward, PhD, prof., Moscow, Russia

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

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

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

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

Nikolaeva Irina, PhD, Moscow, Russia

Pashchenkov Mikhail, MD, PhD, Moscow, Russia

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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

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

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

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

Содержание

Врожденный иммунитет

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

Метаболическое репрограммирование макрофагов при их активации агонистом рецептора NOD1

Клеточная иммунология

Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И.

Терапевтическое действие иммуномодулирующего пептида ТЕККRRRETVEREKE в экспериментальной модели индуцированного язвенного колита у мышей

Имунопатология и клиническая иммунология

Кузьмина У.Ш., Зайнуллина Л.Ф., Садовников С.В., Вахитов В.А., Бахтиярова К.З., Вахитова Ю.В.

NMDA-рецепторы регулируют гены ключевых иммунных функций в лимфоцитах больных рассеянным склерозом

Щубелко Р.В., Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е., Андреев И.В., Авоян Г.Э., Сурова О.С.

Рецидивирующие воспалительные заболевания ротоглотки – роль факторов мукозального иммунитета

Обзоры

Гудима Г.О., Хайтов Р.М.

Молекулярно-биологические подходы к терапии ВИЧ-инфекции. Перспективы применения технологий редактирования генома для элиминации ДНК ВИЧ-1 из инфицированных клеток

Авдеева Ж.И., Солдатов А.А., Медунцын Н.В., Мосягин В.Д., Бондарев В.П., Меркулов В.А.

Критерии определения подобия препаратов моноклональных антител, предназначенных для лечения орфанных заболеваний

Белоглазов В.А., Лугачев Б.И.

Молекулярные механизмы роли Толл-подобных рецепторов 4-го типа и убиквитин-модифицирующего фермента А 20 в патогенезе бронхиальной астмы

Богданова И.М., Болтовская М.Н.

Естественная селекция эмбрионов человека: иммунные механизмы контроля качества

Киселевский М.В., Власенко Р.Я., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г.

Прогностическая значимость опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов

Хроника

Гудима Г.О.

Инновации в аллергологии

Юбилей

Академик Рахим Мусаевич Хайтов

Contents

Innate immunity

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

Metabolic reprogramming of macrophages upon activation with a NOD1 receptor agonist

Cellular immunology

15 Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulaukhanov R.I.

Therapeutic effect of the immunomodulating peptide ТЕККRRRETVEREKE in the experimental model of induced ulcerative colitis in mice

Immunopathology and clinical immunology

27 Kuzmina U.Sh., Zainullina L.F., Sadovnikov S.V., Vakhitov V.A., Bakhtiyarova K.Z., Vakhitova Yu.V.

NMDA-receptors regulate the genes of key immune functions in lymphocytes of multiple sclerosis patients

35 Shchubelko R.V., Zuikova I.N., Shuljenko A.E., Andreev I.V., Avoyan G.E., Surova O.S.

Relapsing inflammatory diseases of the oropharynx – the role of mucosal immunity factors

Reviews

44 Gudima G.O., Khaitov R.M.

Molecular biological approaches to hiv infection therapy. perspectives of usage of genome editing technologies for HIV DNA elimination from infected cells

52 Avdeeva Zh.I., Soldatov A.A., Medunitsyn N.V., Mosjagin V.D., Bondarev V.P., Merkulov V.A.

Criteria of determination of similarity of monoclonal antibodies intended for treatment of orphan diseases

61 Beloglazov V.A., Lugachov B.I.

Molecular mechanisms of the role of Toll-like 4 receptors and ubiquitin-editing enzyme A 20 in the pathogenesis of bronchial asthma

67 Bogdanova I.M., Boltovskaya M.N.

Natural selection of human embryos: immune mechanisms of quality control

73 Kiselevskiy M.V., Vlasenko R.Ya., Zabolina T.N., Kadagidze Z.G.

Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes

Chronicle

83 Gudima G.O.

Innovations in allergy

Anniversary

87 Academician Rakhim Musaevich Khaitov

© Коллектив авторов, 2018

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

Метаболическое репрограммирование макрофагов при их активации агонистом рецептора NOD1

¹ Лаборатория клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115522, Москва, Россия² Лаборатория изучения механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Россия³ Лаборатория экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия

Активация клеток иммунной системы сопровождается перестройкой их метаболизма, или метаболическим репрограммированием. Мурамилпептиды – фрагменты пептидогликана бактерий – активируют клетки врожденной иммунной системы через рецепторы NOD1 и/или NOD2. В работе впервые охарактеризованы изменения углеводного и энергетического метаболизма макрофагов человека, активированных агонистом NOD1 – N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамил-мезо-диаминопимелиновой кислотой (M-триДАП), в сравнении с эффектами агониста рецептора TLR4 – липополисахаридом (ЛПС). По данным анализа метаболизма в реальном времени, оба агониста в течение 1 ч после добавления к клеткам вызвали усиление гликолиза наряду с незначительным снижением потребления кислорода. Влияние обоих агонистов на гликолиз блокировалось ингибитором киназы Akt, но не зависело от активности киназного комплекса mTORC1 и от повышения экспрессии ферментов гликолиза. В отличие от ЛПС M-триДАП практически не индуцировал экспрессию аконитатдекарбоксилазы-1 – фермента, разобщающего цикл Кребса. Влияние 2-дезоксиглюкозы (конкурентного ингибитора гликолиза) и ингибитора Akt на экспрессию цитокинов, индуцированную M-триДАП, было неоднозначным: ингибитор Akt уменьшал экспрессию фактора некроза опухоли (TNF), ИЛ-6 и ИЛ-1β, тогда как 2-дезоксиглюкоза подавляла экспрессию TNF и ИЛ-6 на ранней стадии (1 ч), но усиливала ее на поздней стадии (4–9 ч) после добавления M-триДАП. Обсуждаются возможные механизмы действия указанных ингибиторов на экспрессию и продукцию цитокинов.

Ключевые слова: макрофаги; метаболическое репрограммирование; гликолиз; мурамилпептиды; NOD1

Статья поступила 19.11.2018. Принята в печать 16.01.2019.

Для цитирования: Муругина Н.Е., Балясова Л.С., Будихина А.С., Максимчик П.В., Дагиль Ю.А., Муругин В.В., Чкадуа Г.З., Пинегин Б.В., Пашенков М.В. Метаболическое репрограммирование макрофагов при их активации агонистом рецептора NOD1. Иммунология. 2019; 40 (1): 5–14. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11001.**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-10314.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.Murugina N.E.¹, Balyasova L.S.¹, Budikhina A.S.¹, Maximchik P.V.²,
Dagil Yu.A.¹, Murugin V.V.¹, Chkadua G.Z.³, Pinegin B.V.¹, Pashenkov M.V.¹

Metabolic reprogramming of macrophages upon activation with a NOD1 receptor agonist

¹ Laboratory of Clinical Immunology, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, 115522, Moscow, Russia² Laboratory for the study of apoptosis mechanisms of the Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia³ Laboratory of Experimental Diagnostics and Biotherapy of Tumors, Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, 115478, Moscow, Russia

Activation of immune system cells is accompanied by a profound rearrangement of their metabolism, or metabolic reprogramming. Muramyl peptides, which are fragments of bacterial peptidoglycan, activate innate immune cells through NOD1 and/or NOD2 receptors. Here, we characterize, for the first time, alterations of carbohydrate and energy metabolism of human macrophages activated by a NOD1 agonist, N-acetyl-D-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-meso-diaminopimelic acid (M-triDAP) in comparison with a TLR4 agonist, lipopolysaccharide (LPS). Real-time analysis of cell metabolism showed that both agonists, within 1 h after addition to cells, boosted glycolysis along with a minor reduction of oxygen consumption.

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

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

The effect of either agonist on glycolysis was blocked by an Akt kinase inhibitor, but was independent of the mTORC1 kinase complex and elevation of glycolytic enzyme expression. Unlike LPS, M-triDAP caused almost no induction of aconitate decarboxylase 1, an enzyme breaking the Krebs' cycle. The effect of 2-deoxyglucose (a competitive inhibitor of glycolysis) and Akt inhibitor on M-triDAP-induced cytokine expression was ambiguous. The Akt inhibitor reduced TNF, IL-6 and IL-1 β , expression, whereas 2-DG inhibited TNF and IL-6 expression at an early stage (1 h), but enhanced it at a late stage (4–9 h) after addition of M-triDAP. Mechanisms whereby these inhibitors affect cytokine expression are discussed.

Keywords: macrophages; metabolic reprogramming; glycolysis; muramyl peptides; NOD1

Received 19.11.2018. **Accepted** 16.01.2019.

For citation: Murugina N.E., Balyasova L.S., Budikhina A.S., Maximchik P.V., Dagil Yu.A., Murugin V.V., Chkadua G.Z., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. Metabolic reprogramming of macrophages upon activation with a nod1 receptor agonist. *Immunologiya*. 2019; 40 (1): 5–14. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11001. (in Russian)

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

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

При активации клеток врожденной иммунной системы происходит масштабная перестройка их метаболизма, или метаболическое репрограммирование, которое является базисом для других процессов, протекающих в активированных клетках, таких как синтез цитокинов и эффекторных молекул, пролиферация, миграция и т. д. [1, 2]. При этом конкретные характеристики метаболического репрограммирования зависят от вида активирующего стимула. Так, в покоящихся макрофагах основным источником энергии является окислительное фосфорилирование (ОФ). Активация макрофагов по провоспалительному M1-типу, индуцируемая агонистами паттерн-распознающих рецепторов (ППР) и интерфероном- γ , сопровождается переходом клеток на так называемый аэробный гликолиз [1], разобщением цикла Кребса [3] и угнетением ОФ [4]. Активация макрофагов по противовоспалительному M2-типу, индуцируемая интерлейкином-4 (ИЛ-4), характеризуется усилением глутаминолиза и β -окисления жирных кислот [3, 5]. Высказываются предположения, что тип метаболизма не только обеспечивает конкретные функциональные потребности клеток, но и в известной мере определяет направление их активации и дифференцировки [6]. Таким образом появляется возможность воздействовать на ход иммунного ответа, влияя на метаболизм клеток иммунной системы [7, 8].

Под аэробным гликолизом понимают такое состояние метаболизма, при котором, несмотря на достаточное поступление кислорода в клетку, основным источником энергии является гликолиз (не требующий присутствия кислорода). Хотя при гликолизе образуются лишь 2 молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) на 1 молекулу глюкозы (в отличие от 30–36 молекул АТФ при окислительном фосфорилировании), АТФ генерируется при гликолизе быстрее, чем при окислительном фосфорилировании, что компенсирует низкую энергоэффективность [9, 10]. Кроме того, продукты гликолиза являются исходным материалом в биосинтетических процессах, интенсивно протекающих в активированных клетках иммунной системы [9]. Переход клеток с ОФ на аэробный гликолиз сопровождается увеличением потребления глюкозы и образования лактата – побочного продукта гликолиза. Перестройка метаболизма глюкозы при активации клеток обеспечивается как минимум двумя

механизмами: быстрым, связанным с внутриклеточным перераспределением ферментов гликолиза, и медленным, связанным с активацией транскрипции генов, кодирующих ферменты гликолиза [11–13]. Аэробный гликолиз рассматривается как метаболическая основа воспаления [1].

Из всего многообразия микробных соединений – агонистов ППР – для изучения метаболического репрограммирования клеток врожденного иммунитета в основном используется липополисахарид (ЛПС), агонист рецептора TLR4 [3, 12, 14–16]. Гораздо меньше известно о перестройке метаболизма под действием агонистов других ППР. В частности, не изучено метаболическое репрограммирование при активации рецепторов NOD1 и NOD2, агонистами которых являются мурамилпептиды – фрагменты пептидогликана бактерий [17, 18]. Изучение этого вопроса представляет интерес, поскольку мурамилпептиды и их производные являются перспективными иммуностимуляторами и иммунологическими адъювантами.

Мы впервые изучили метаболическое репрограммирование макрофагов, индуцированное веществом мурамилпептидной природы. В работе использовался мурамилпептид M-триДАП (N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамил-мезо-диаминопимелиновая кислота), который является сильным агонистом NOD1 с небольшой активностью в отношении NOD2 [19, 20]. Веществом сравнения служил ЛПС.

Материал и методы

Реактивы. Рекомбинантный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) был закуплен у фирмы Miltenyi Biotec (ФРГ), M-триДАП – у Invivogen (США), ЛПС *E. coli* O111:B4, 2-дезоксиглюкоза (2-ДГ) и олигомицин – у Sigma (США), рапамицин – у Merck Millipore (Франция), ингибиторы Akt-I-1/2, PFK-15 и AZ PFKFB3 67 – у Tocris (США). Полная культуральная среда (ПКС) представляла собой RPMI-1640 (Life Technologies, Великобритания) с добавлением 2 мМ L-глутамин (Life Technologies) и 10% фетальной телячьей сыворотки (РАА, Австрия).

Получение и стимуляция макрофагов. Культуры макрофагов были получены путем 6-суточного культивирования моноцитов крови доноров с ГМ-КСФ, как было описано ранее [21]. По истечении 6 сут клетки рипсинизировали, отмывали, подсчитывали и помещали в 24-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Республика Корея) в количестве 250 тыс. клеток в 500 мкл ПКС на лунку. Рабочие растворы М-триДАП и ЛПС готовили на ПКС, и по 25 мкл этих растворов добавляли в лунки. Конечная концентрация М-триДАП составляла 10 мкг/мл (данная концентрация определена как оптимальная по результатам более ранних опытов [20, 21]). Конечная концентрация ЛПС составляла 100 нг/мл. В лунки отрицательного контроля добавляли 25 мкл чистой ПКС. Если использовались ингибиторы ферментов, их вносили за 30 мин до добавления стимуляторов. Планшеты инкубировали 24 ч при +37 °С в атмосфере 5% CO₂, после чего собирали супернатанты для определения концентраций глюкозы, лактата и фактора некроза опухоли (TNF).

Исследование потребления глюкозы, высвобождения лактата и TNF. Концентрацию глюкозы в культуральных супернатантах и в ПКС определяли на биохимическом анализаторе Synchron CX5 Pro (Beckman Coulter, США). Потребление глюкозы (ПГ) одной клеткой за 24 ч рассчитывали по формуле:

$$\text{ПГ} = (C_{\text{ПКС}} - C_{\text{супернатант}}) \cdot 5 \cdot 10^{-4} / 250\,000,$$

где $5 \cdot 10^{-4}$ – объем культуры (в литрах), 25 000 – количество клеток в культуре.

Результаты нормализовали по количеству клеточного белка, принимая количество белка в нестимулированной лунке в данном опыте за 100%. Концентрации лактата измеряли колориметрическим методом с помощью набора реактивов фирмы Biovision (США). Высвобождение лактата в расчете на клетку вычисляли аналогично потреблению глюкозы. Уровни TNF в супернатантах определяли с помощью иммуоферментного анализа, используя наборы реактивов фирмы «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия).

Анализ клеточного метаболизма в реальном времени. Скорость закисления внеклеточной среды (extracellular acidification rate – ECAR) и скорость потребления кислорода (oxygen consumption rate – OCR) измеряли на приборе Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent Technologies, США). ECAR и OCR отражают интенсивность, соответственно, гликолиза и митохондриального дыхания. Изменения pH и содержания кислорода фиксируются чувствительными датчиками в тонком слое среды, прилегающем к клеточному монослою. Макрофаги высевали в планшеты Seahorse XFe96 (Agilent) в количестве 16 000 клеток на лунку в 80 мкл ПКС. Наутро производили замену ПКС на специальную среду, представляющую собой XF base medium (Agilent) с добавлением 2 mM L-глутамин, 11 mM D-глюкозы (Sigma) и 10% фетальной телячьей сыворотки. После уравнивания pH в инкубаторе с атмосферным воздухом планшеты переносили в прибор. ECAR и OCR измеряли каждые 9 мин (продолжительность измерений 3 мин). После 3 базальных измерений впрыскивали стимуляторы (растворы

М-триДАП, ЛПС или среды) и делали еще 22 измерения. Ингибиторы ферментов впрыскивали после 3 базальных измерений, после чего делали еще 3–6 измерений, а затем впрыскивали стимуляторы. Результаты нормализовали по клеточному белку. Вычисляли площади под кривыми «время–ответ» (AUC) после добавления стимулов.

Исследование экспрессии генов с помощью полимеразной цепной реакции обратного транскрипта в реальном времени. Экспрессию генов в М-триДАП- и ЛПС-стимулированных макрофагах анализировали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени, как было описано ранее [22]. Дизайн праймеров осуществляли с помощью онлайн-сервиса Primer-BLAST. Относительную экспрессию (ОЭ) генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Референс-образцом, в котором ОЭ всех генов равнялась 1, служили нестимулированные клетки данного донора. В качестве нормировочного гена использовали *GAPDH*, экспрессия которого была наименее вариабельной из всех исследованных генов. Коэффициент вариации порогового цикла (C_t) для *GAPDH* в рамках опыта составил $2,18 \pm 0,65\%$ (по данным 6 независимых опытов); для сравнения, коэффициент вариации C_t *ACTB* – другого часто используемого нормировочного гена – составил $3,67 \pm 0,6\%$. Относительную экспрессию самого *GAPDH* вычисляли по методу $2^{-\Delta C_t}$ (без нормировки).

Вестерн-блоттинг. Методика подробно была описана ранее [22]. Для определения киназы Akt, фосфорилированных форм Akt (p-T308 и p-S473) и аконитатдекарбокксилазы-1 (ACOD1) использовали поликлональные кроличьи антитела производства Cell Signaling Technologies (США), для определения α -тубулина – мышечные моноклональные антитела (клон DM1A) производства Novus Biologicals (США).

Статистика. Все значения p получены с помощью парного t -теста. Для статистической обработки использовали программу GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, США).

Результаты

Экспрессия TNF, ИЛ-6, ИЛ-1 β при стимуляции макрофагов М-триДАП и липополисахаридом. М-триДАП и ЛПС вызывали мощную, примерно сопоставимую секрецию TNF макрофагами (рис. 1, А). Оба стимула индуцировали экспрессию мРНК TNF с максимумом в точке 1 ч, а также мРНК ИЛ-6 и ИЛ-1 β с максимумом в точке 4 ч (рис. 1, Б–Г).

Изменения метаболизма глюкозы при стимуляции М-триДАП и липополисахаридом. В процессе гликолиза 1 молекула глюкозы расщепляется до 2 молекул пирувата, при этом образуется 2 молекулы АТФ и потребляются (восстанавливаются) 2 молекулы NAD⁺. Запасы NAD⁺ восстанавливаются двумя путями: 1) путем отдачи электронов в митохондриальную дыхательную цепь; 2) в реакции превращения пирувата в лактат, который высвобождается из клетки и приводит к закислению среды.

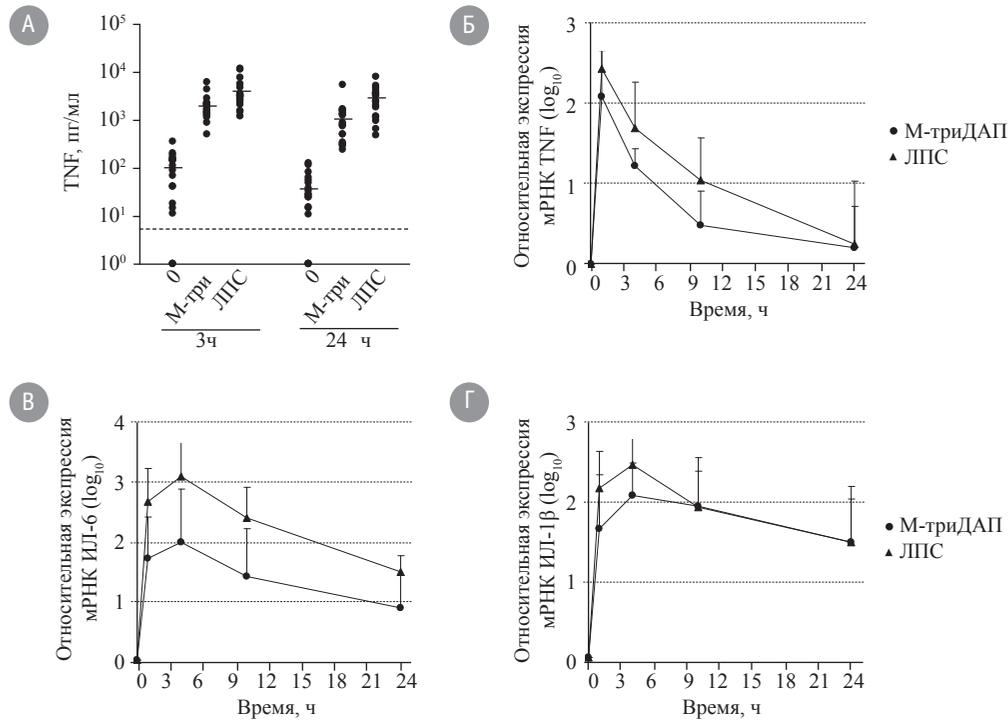


Рис. 1. Экспрессия провоспалительных цитокинов макрофагами при стимуляции М-триДАП и ЛПС А – уровни TNF в супернатантах макрофагов после 3 и 24 ч культивирования без стимуляторов (0), с М-триДАП (10 мкг/мл) и с ЛПС (100 нг/мл). 18 доноров. Горизонтальные линии в каждой группе – средние значения, пунктирная линия – нижний предел определения в ИФА; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (парный t -test); Б – кинетика экспрессии мРНК TNF; В – ИЛ-6; Г – ИЛ-1 β макрофагами при стимуляции М-триДАП и ЛПС. $M \pm \sigma$, 9 доноров.

М-триДАП и ЛПС вызвали сопоставимое по величине повышение скорости закисления среды (ЕСАР) (рис. 2, А, Б). Это повышение начиналось в течение 1 ч после впрыска стимуляторов и достигало максимума примерно в течение 2 ч с последующим более плавным снижением (см. рис. 2, А). В качестве положительного контроля использовали олигомицин – ингибитор митохондриальной АТФ-синтазы, заставляющий клетку максимально задействовать свой гликолитический резерв. Олигомицин вызывал более быстрое повышение ЕСАР с выходом на верхнее плато в течение 30–40 мин (см. рис. 2, А). Как видно из рис. 2, А, на пике ответа на М-триДАП и ЛПС клетки практически полностью задействовали гликолитический резерв. В период между 3 и 20 ч после начала стимуляции ЕСАР не измеряли, однако в макрофагах, исследованных через 20 ч после стимуляции М-триДАП, ЕСАР оставалась достоверно повышенной, тогда как ЛПС-стимулированные макрофаги по этому показателю не отличались от нестимулированных клеток (рис. 2, В).

Так, OCR в первые часы после стимуляции М-триДАП и ЛПС незначительно падала (рис. 2, Г, Д), тогда как в присутствии олигомицина она падала более чем на $\frac{2}{3}$ (см. рис. 2, Д). Через 20 ч после начала стимуляции М-триДАП-стимулированные макрофаги характеризовались повышенным OCR по сравнению с контрольными нестимулированными клетками, тогда как у ЛПС-стимулированных макрофагов этот показатель не отличался от контроля (рис. 2, Е).

Чтобы подтвердить, что повышение ЕСАР при стимуляции клеток обусловлено именно приростом гликолиза, использовали конкурентный ингибитор гликолиза – 2-ДГ. Добавление 2-ДГ в концентрации 50 мМ (5-кратный избыток по отношению к концентрации глюкозы в культуральной среде) приводило к снижению базальной ЕСАР и полной отмене повышения ЕСАР в М-триДАП и ЛПС-стимулированных клетках (рис. 2, Ж). Кроме того, и М-триДАП, и ЛПС вызывали повышение суточного потребления глюкозы примерно на 40% (рис. 2, З), что тоже указывает на интенсификацию гликолиза и согласуется с изменениями ЕСАР. При этом высвобождение лактата достоверно повышалось только при стимуляции ЛПС (рис. 2, И). В ходе гликолиза из 1 моля глюкозы может образоваться 2 моля лактата. Соотношение измеренного количества лактата (см. рис. 2, И) к рассчитанному, исходя из данных по потреблению глюкозы (рис. 2, З) составило $74,5 \pm 15,8\%$ у нестимулированных, $63 \pm 17,9\%$ у М-триДАП-стимулированных и $87,1 \pm 24,6\%$ у ЛПС-стимулированных клеток. Хотя эти различия не были статистически достоверными, наблюдается тенденция к занижению измеренных уровней лактата по сравнению с расчетными при стимуляции М-триДАП. Известно, что лактат может реутилизироваться клетками с превращением в пируват [23, 24]. Поскольку М-триДАП и ЛПС вызывали сопоставимое повышение ЕСАР (т. е. сопоставимое высвобождение лактата; см. рис. 2, А, Б), можно предположить, что у макрофагов,

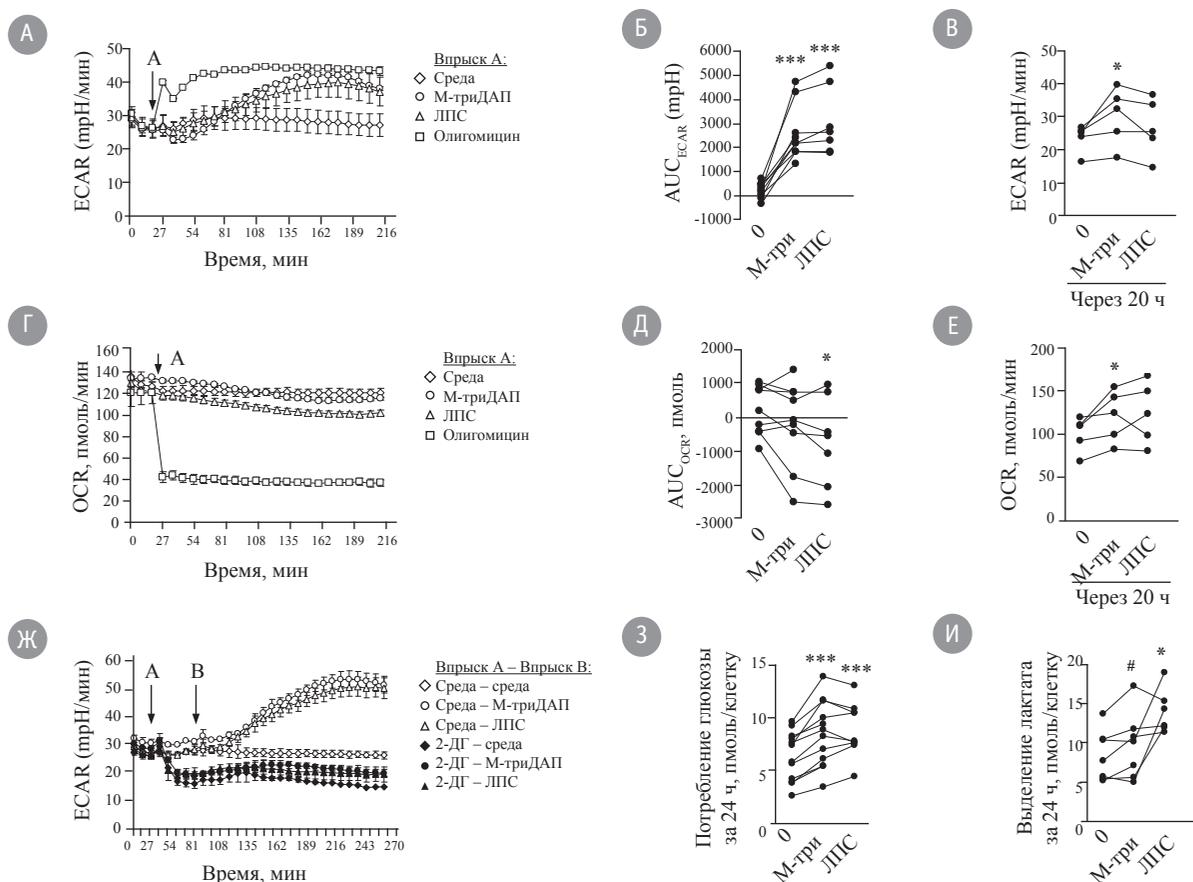


Рис. 2. Изменения углеводного и энергетического метаболизма макрофагов при стимуляции М-триДАП и ЛПС А – кинетика ECAR и Г – OCR в культурах макрофагов после впрыска среды, М-триДАП (конечная 10 мкг/мл), ЛПС (конечная 100 нг/мл) и олигомицина (конечная 2 мкМ). 1 репрезентативный опыт из 9 ($M \pm \sigma$ по 4 повторностям); Б – площади под кинетическими кривыми ECAR и Д – OCR 9 экспериментов; В – значения ECAR и Д – OCR после 20-часового культивирования макрофагов без стимуляторов, с М-триДАП и с ЛПС. 5 экспериментов; Ж – влияние 2-ДГ (50 мМ) на ECAR в базальных условиях и при стимуляции М-триДАП и ЛПС. 1 репрезентативный опыт из 3. З – потребление глюкозы, высвобождение лактата (И) макрофагами за 24 ч в расчете на 1 клетку в базальных условиях и в присутствии М-триДАП и ЛПС (6–12 доноров на точку). На графиках Б, В, Д, Е, З, И значения, полученные у одного и того же донора, для наглядности соединены линиями. Значения достоверности: # – $p = 0,07$, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ при сравнении с нестимулированными клетками парным *t*-тестом.

стимулированных М-триДАП, имеется тенденция к повышению утилизации лактата.

Роль киназы Akt и комплекса mTORC1 в изменениях метаболизма глюкозы при стимуляции М-триДАП и липополисахаридом. Наблюдаемая по данным ECAR интенсификация гликолиза при стимуляции макрофагов, развивается достаточно быстро, и, видимо, она не связана с изменениями экспрессии генов, по крайней мере на раннем этапе. Быстрое усиление гликолиза в дендритных клетках при стимуляции ЛПС связывают с перераспределением гексокиназы-II из цитозоля на наружную мембрану митохондрий, где этот фермент, катализирующий первую реакцию гликолиза, становится полностью активным [25]. Для связывания гексокиназы-II с митохондриями необходимо ее фосфорилирование по треонину-473, которое осуществляется киназой Akt [12, 26]. По данным вестерн-блоттинга, в макрофагах, стимулированных М-триДАП

и ЛПС, происходило повышение уровня фосфорилирования Akt по треонину-308 и серину-473 примерно через 0,5–1 ч после начала стимуляции (рис. 3, А), что совпадает по времени с началом роста ECAR (рис. 3, Б). Специфический ингибитор Akt (Akt-I-1/2 [27]) подавлял как базальные показатели гликолиза макрофагов, так и их повышение при добавлении М-триДАП и ЛПС (рис. 3, Б–Д). В целом, эффекты ингибитора Akt на гликолиз в макрофагах аналогичны эффектам 2-ДГ.

Более медленный механизм гликолитического репрограммирования основан на повышении экспрессии генов, кодирующих ферменты гликолиза. В этом механизме тоже участвует Akt, которая активирует киназный комплекс mTORC1 с последующей активацией фактора транскрипции HIF-1 α , регулирующего экспрессию указанных генов [13]. Мы изучили экспрессию мРНК ряда ферментов, которые либо являются узкими местами гликолитического каскада, либо подвержены

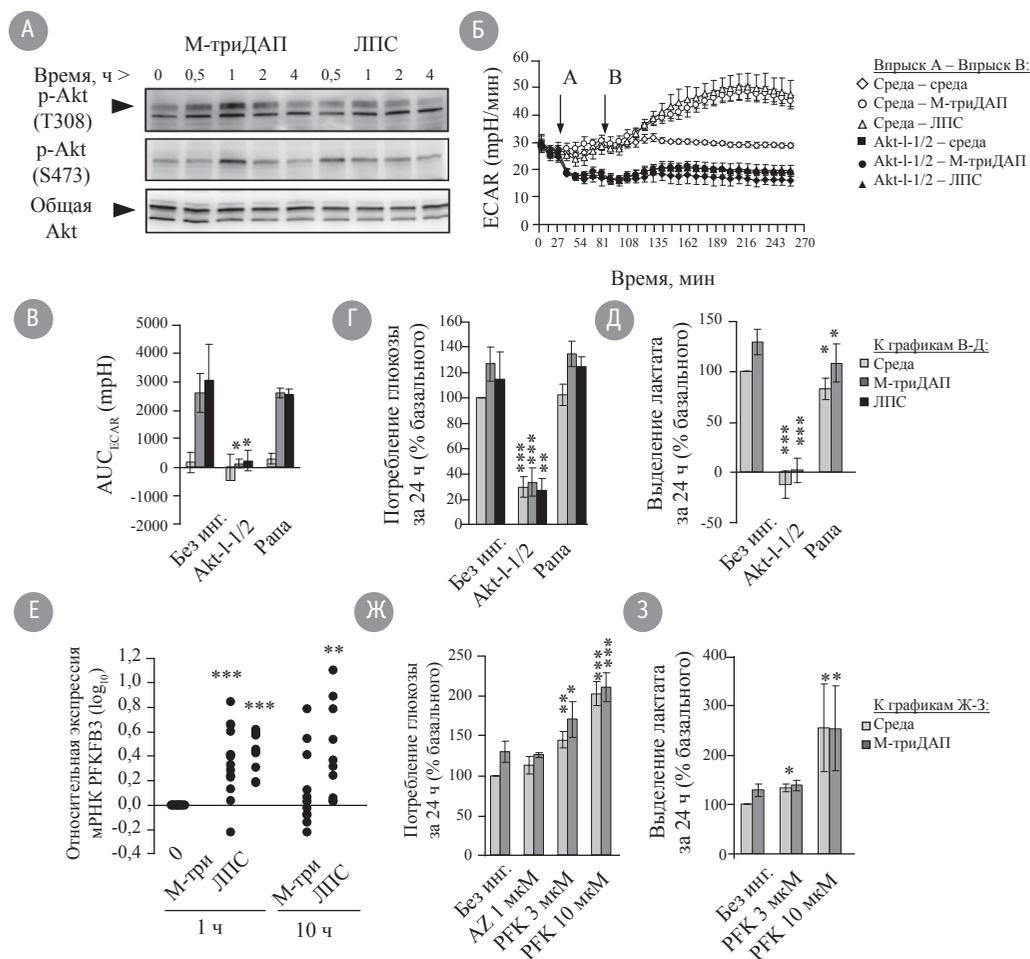


Рис. 3. Роль киназ Akt, mTORC1 и PFKFB3 в метаболическом репрограммировании макрофагов под действием М-триДАП и ЛПС. А – кинетика фосфорилирования Akt по треонину-308 и серину-473 при стимуляции (1 репрезентативный опыт из 3); Б – влияние специфического ингибитора Akt (Akt-I-1/2, 10 мкМ) на параметры ECAR (1 опыт из 4); В – площади под кинетическими кривыми ECAR в присутствии Akt-I-1/2 (10 мкМ) и рапамицина (10 нМ); Г – влияние Akt-I-1/2 и рапамицина на 24-часовое потребление глюкозы и Г – высвобождение лактата в базальных условиях и в присутствии М-триДАП и ЛПС ($M \pm \sigma$, 4 донора). Значения достоверности на графиках В, Г, Д указаны по отношению к клеткам, культивируемым с тем же стимулятором, но без ингибиторов (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, парный *t*-тест); Е – экспрессия мРНК PFKFB3 при стимуляции М-триДАП и ЛПС (11 доноров); значения достоверности указаны по отношению к нестимулированным клеткам (** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$); Ж – влияние специфических ингибиторов PFKFB3 (AZ PFKFB3 67 [AZ] и PFK15 [PFK]) на 24-часовое потребление глюкозы (Ж) и З – высвобождение лактата в базальных условиях и при стимуляции М-триДАП ($M \pm \sigma$, 4 донора). Значения достоверности на графиках Ж и З указаны по отношению к клеткам, культивируемым с тем же стимулятором, но без ингибиторов (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, парный *t*-тест).

транскрипционной регуляции при активации клеток [13]. Экспрессия генов гексокиназ (HK1, HK2, HK3), L- и M-субъединиц фосфофруктокиназы-1 (PFKL, PFKM), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), M1- и M2-изоформ пируваткиназы (PKM1 и PKM2), а также M-субъединицы лактатдегидрогеназы (LDHA) после 1, 10 и 24 ч стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС не изменялась (данные не показаны). Кроме того, рапамицин – специфический ингибитор mTORC1 – не влиял на базальные и стимулированные параметры гликолиза (рис. 3, В–Д), что исключает роль сигнального пути Akt – mTORC1 – HIF-1 α в изменениях гликолиза, наблюдаемых при стимуляции макрофагов в наших экспериментах.

Роль фермента PFKFB3 в изменениях метаболизма глюкозы. По данным литературы, существенную роль в метаболическом репрограммировании играет фермент PFKFB3, или индуцибельная 6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бисфосфатаза [11, 28]. Этот фермент не участвует в основном гликолитическом каскаде, но катализирует превращение фруктозо-6-фосфата (одного из промежуточных продуктов гликолиза) во фруктозо-2,6-бисфосфат; последний аллостерически активирует фосфофруктокиназу-1 – третий фермент гликолитического каскада, что приводит к стимуляции гликолиза. В наших экспериментах достоверное повышение экспрессии PFKFB3 в М-триДАП-стимулированных клетках отмечалось

в точке 1 ч, а в ЛПС-стимулированных – в точках 1 и 10 ч (рис. 3, Е). Однако два высокоспецифичных ингибитора PFKFB3 (AZ PFKFB3 67 и PFK15 [29, 30]) не повлияли на ECAR (данные не показаны), а один из ингибиторов даже повысил потребление глюкозы макрофагами в базальных условиях и при стимуляции М-триДАП (рис. 3, Ж). Таким образом, роль PFKFB3 в гликолитическом репрограммировании макрофагов остается неясной.

Влияние 2-ДГ и ингибитора Akt на экспрессию провоспалительных цитокинов. Эффект 2-ДГ на продукцию TNF оказался двунаправленным, что было для нас несколько неожиданным. На раннем этапе активации (3 ч) 2-ДГ в концентрации 50 мМ ингибировала секрецию TNF, индуцированную М-триДАП и ЛПС, тогда как на позднем этапе (24 ч) – напротив, вызывала повышение уровней TNF в супернатантах (рис. 4, А). Оба эффекта 2-ДГ были дозозависимыми и проявлялись также в концентрациях 10 и 2 мМ (данные не показаны). Иная картина наблюдалась при использовании Akt-I-1/2: этот ингибитор подавлял М-триДАП-индуцированную продукцию TNF как на

ранних, так и на поздних сроках, но не влиял на ЛПС-индуцированную продукцию TNF (рис. 4, Б).

Влияние 2-ДГ на экспрессию мРНК цитокинов тоже было двунаправленным (рис. 4, В). 2-ДГ ингибировала раннюю экспрессию TNF, ИЛ-6 и ИЛ-1 β (через 1 ч после добавления М-триДАП и ЛПС). Однако в более поздние сроки (4 и 9 ч) 2-ДГ усиливала М-триДАП- и ЛПС-индуцированную экспрессию TNF, а также М-триДАП-индуцированную экспрессию ИЛ-6, тогда как ингибирующий эффект 2-ДГ на ЛПС-индуцированную экспрессию ИЛ-6 и на экспрессию ИЛ-1 β , наблюдавшийся на ранних сроках, на более поздних сроках исчезал. Фактически в присутствии 2-ДГ экспрессия провоспалительных цитокинов, в частности TNF, не подавлялась, а смещалась на более поздние сроки после активации клетки.

Ингибитор Akt-I-1/2 подавлял экспрессию мРНК ИЛ-6 и в меньшей степени TNF и ИЛ-1 β , в М-триДАП-стимулированных клетках на раннем сроке активации (1 ч), не влияя на эти показатели на более поздних сроках (рис. 4, Г). Akt-I-1/2 не влиял на ЛПС-индуцированную экспрессию мРНК цитокинов (см. рис. 4, Г), что согласуется с данными по секреции TNF (см. рис. 4, Б).

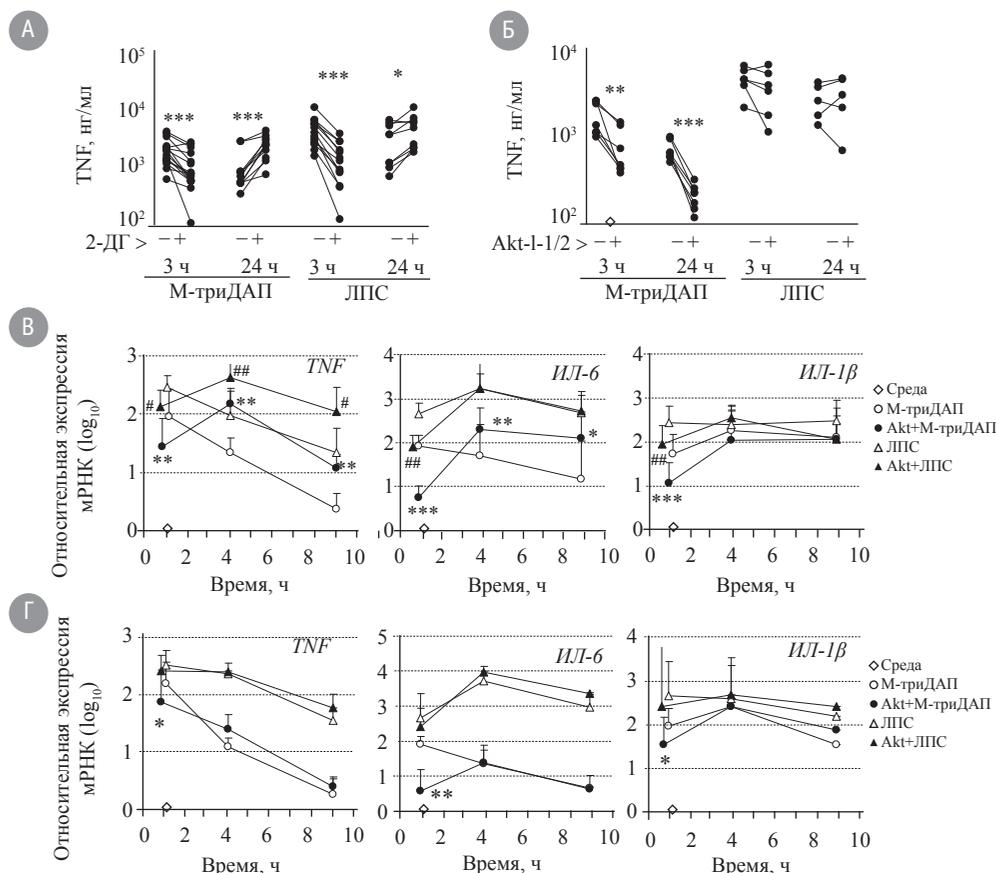


Рис. 4. Влияние 2-ДГ (50 мМ) и Akt-I-1/2 (10 мкМ) на продукцию и экспрессию провоспалительных цитокинов макрофагами, стимулированными М-триДАП и ЛПС

А – влияние 2-ДГ; Б – Akt-I-1/2 на уровни TNF в супернатантах макрофагов через 3 и 24 ч после добавления М-триДАП и ЛПС. От 6 до 16 доноров на точку. В – влияние 2-ДГ; Г – Akt-I-1/2 на кинетику экспрессии мРНК TNF, ИЛ-6 и ИЛ-1 β при стимуляции М-триДАП и ЛПС ($M \pm \sigma$, 3 донора). Значения достоверности на графиках В и Г: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ при сравнении с макрофагами в той же точке, стимулированными М-триДАП в отсутствие ингибиторов; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ при сравнении с макрофагами в той же точке, стимулированными ЛПС в отсутствие ингибиторов.

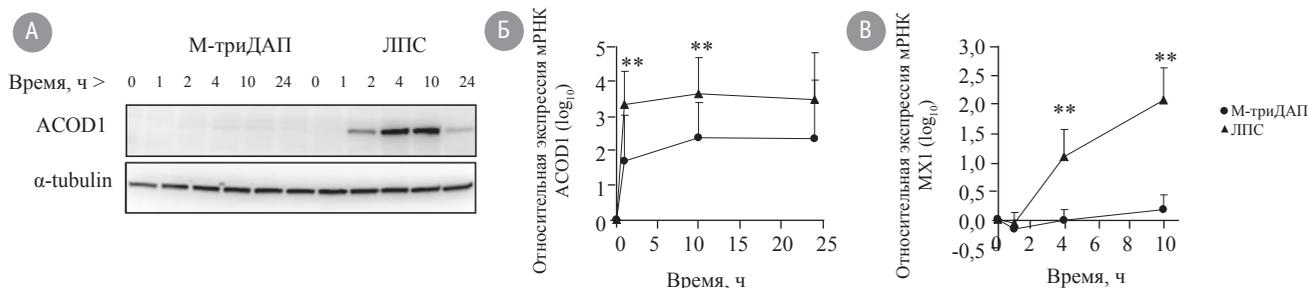


Рис. 5. Экспрессия ACOD1 и MX1 макрофагами при стимуляции М-триДАП и ЛПС

А – кинетика экспрессии белка ACOD1 (вестерн-блоттинг), 1 репрезентативный опыт из 3; Б, В – кинетика экспрессии мРНК ACOD1 и MX1 при стимуляции М-триДАП и ЛПС ($M \pm \sigma$, 6 доноров); ** – $p < 0,01$ при сравнении М-триДАП- и ЛПС-стимулированных макрофагов в данной точке.

Индукция экспрессии аконитатдекарбоксилазы-1

(ACOD1). Характерной чертой метаболического репрограммирования макрофагов при стимуляции ЛПС является индукция гена ACOD1 (другое название – IRG1) [31]. Фермент ACOD1 декарбоксилирует цис-аконитат – один из метаболитов цикла Кребса – с образованием итаконата [31]. Поскольку нормальный ход цикла Кребса предполагает превращение цис-аконитата в изоцитрат и далее в α -кетоглутарат, то вследствие активности ACOD1 цикл Кребса прерывается (за счет изъятия цис-аконитата), возобновляясь со стадии α -кетоглутарата, запасы которого пополняются благодаря глутаминолизу [3]. Итаконат обладает выраженной антимикробной активностью [31], ингибирует сукцинатдегидрогеназу, вызывая второй разрыв цикла Кребса [16, 32], а также ингибирует экспрессию ИЛ-1 β [16, 33].

В нестимулированных макрофагах экспрессия белка ACOD1 не определялась (рис. 5, А). При стимуляции макрофагов ЛПС наблюдалась мощная индукция мРНК и белка ACOD1 (рис. 5, А, Б), что согласуется с литературными данными. В макрофагах, стимулированных М-триДАП, уровни мРНК ACOD1 были на порядок ниже, а белок ACOD1 присутствовал лишь в следовых количествах (см. рис. 5, А, Б).

По данным литературы, для индукции экспрессии ACOD1 необходимо аутокринное действие интерферонов I типа [33]. Поэтому мы изучили экспрессию MX1 – интерферон-индуцибельного гена, являющегося маркером эндогенной продукции интерферонов. При стимуляции ЛПС наблюдалось повышение экспрессии MX1 через 4 ч и позже (рис. 5, В), что, вероятно, объясняется индукцией выработки интерферона- β через TRIF-зависимый сигнальный путь. В макрофагах, стимулированных М-триДАП, экспрессия MX1 не менялась (рис. 5, В). Таким образом, экспрессия ACOD1 действительно коррелирует с отсутствием/наличием индукции эндогенных интерферонов. Однако из рис. 5 видно, что повышение мРНК ACOD1 до максимального уровня происходило уже через 1 ч после добавления стимуляторов (т. е. раньше повышения мРНК MX1), что не может быть объяснено аутокринным действием интерферонов, для выработки которых требуется не менее 2–3 ч.

Обсуждение

Проведенная работа показала, что характеристики метаболического репрограммирования макрофагов, активированных агонистом NOD1 (М-триДАП) и стандартным стимулом (ЛПС), во многом схожи. По данным анализа метаболизма в реальном времени, оба агониста вызывают быстрый прирост гликолиза наряду с незначительным снижением потребления кислорода, что может расцениваться как активация аэробного гликолиза. Влияние обоих агонистов на гликолиз зависит от активности киназы Akt, но не зависит от активности комплекса mTORC1 и повышения экспрессии ферментов гликолиза. Указанные процессы, вероятно, являются стереотипным ответом клеток врожденного иммунитета на стимуляцию PPP [12], хотя выраженность ответа может зависеть от вида и дозы стимула. В то же время выявлены особенности метаболического репрограммирования, индуцированного агонистом NOD1 по сравнению с ЛПС: 1) более устойчивое повышение ECAR, сохраняющееся спустя 20 ч после добавления агониста; 2) тенденция к утилизации высвобождаемого клетками лактата; 3) практическое отсутствие индукции ACOD1 и, следовательно, сохранение непрерывности цикла Кребса. Возможно, эти особенности связаны между собой: поскольку поглощаемый клеткой лактат метаболизируется в цикле Кребса, непрерывность цикла может способствовать переработке больших количеств лактата М-триДАП-стимулированными клетками по сравнению с ЛПС-стимулированными.

Особый интерес представляет связь между параметрами гликолиза и экспрессией провоспалительных цитокинов. В нашей работе гликолиз в макрофагах ингибировали два соединения: 2-ДГ и ингибитор Akt. Однако их эффект на экспрессию TNF, ИЛ-6 и ИЛ-1 β оказался неодинаков и неоднозначен. Это заставляет предполагать, что влияние 2-ДГ и ингибитора Akt на экспрессию цитокинов обусловлено не только и не столько ингибированием гликолиза, сколько воздействием на другие процессы и сигнальные пути. Так, ингибитор Akt снижал М-триДАП-индуцированную экспрессию TNF, ИЛ-6 и ИЛ-1 β , но практически не влиял на ЛПС-индуцированную экспрессию этих же цитоки-

нов. Известно, что киназа Akt участвует в различных сигнальных путях, связанных с активацией и дифференцировкой макрофагов [34], хотя о вовлеченности Akt в сигнальные пути от рецепторов NOD1 и NOD2 до сих пор не сообщалось.

2-ДГ подавляла раннюю стадию экспрессии цитокинов при активации клеток М-триДАП и ЛПС, но усиливала позднюю стадию, фактически сдвигая экспрессию цитокинов на более поздний срок после начала активации. Литературные данные о влиянии 2-ДГ на продукцию цитокинов противоречивы. Сообщалось как об ингибирующем [12, 35–37], так и об усиливающем [38] действии 2-ДГ на ЛПС-индуцированную продукцию TNF и ряда других цитокинов, а также об отсутствии эффекта [39]. Описания ингибирующего действия 2-ДГ также противоречивы. По данным В. Everts и соавт., 2-ДГ не влияет на экспрессию мРНК TNF, ИЛ-6 и ряда других цитокинов при 3-часовой активации мышинных дендритных клеток ЛПС, но ингибирует секрецию этих цитокинов, что указывает на избирательное действие 2-ДГ на посттранскрипционные этапы продукции цитокинов [12]. Однако по данным Na и соавт., в мышинных макрофагах ингибируется также ЛПС-индуцированная

экспрессия мРНК TNF, ИЛ-6 и ИЛ-1 β , на ранних этапах активации (1–4 ч) [37]. Возможно, наблюдаемые различия в эффектах 2-ДГ зависят от вида животных, типа клеток, а также от времени, прошедшего после добавления агонистов ПРР, о чем говорят и данные настоящей работы. Механизмы действия 2-ДГ как ингибитора гликолиза на экспрессию цитокинов могут быть разнообразны. В частности, ферменты гликолиза GAPDH и РКМ2 могут транслоцироваться в ядро и выступать в качестве непосредственных транскрипционных и посттранскрипционных регуляторов экспрессии цитокинов, причем данная функция GAPDH и РКМ2 зависит от интенсивности гликолиза [36, 40]. Позднее усиливающее влияние 2-ДГ на экспрессию цитокинов может реализовываться через создание оксидативного стресса в клетке [41], однако этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Таким образом, в работе впервые охарактеризованы изменения углеводного и энергетического метаболизма макрофагов при их активации веществом мурамилпептидной природы. Показана неоднозначность влияния ингибиторов гликолиза на продукцию и экспрессию провоспалительных цитокинов.

■ Литература/References

1. O'Neill L.A., Pearce E.J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med.* 2015; 213 (1): 15–23.
2. Buck M.D., O'Sullivan D., Pearce E.L. T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.* 2015; 212 (9): 1345–60.
3. Jha A.K., Huang S.C., Sergushichev A., Lampropoulou V. et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity.* 2015; 42 (3): 419–30.
4. Mills E.L., Kelly B., Logan A., Costa A.S.H. et al. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. *Cell.* 2016; 167 (2): 457–70.e13.
5. Huang S.C., Everts B., Ivanova Y., O'Sullivan D. et al. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat. Immunol.* 2014; 15 (9): 846–55.
6. Van den Bossche J., O'Neill L.A., Menon D. Macrophage immunometabolism: where are we (going)? *Trends Immunol.* 2017; 38 (6): 395–406.
7. Stienstra R., Netea-Maier R.T., Riksen N.P., Joosten L.A.B. et al. Specific and complex reprogramming of cellular metabolism in myeloid cells during innate immune responses. *Cell Metab.* 2017; 26 (1): 142–56.
8. Ip W.K.E., Hoshi N., Shouval D.S., Snapper S. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science.* 2017; 356 (6337): 513–9.
9. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009; 324 (5930): 1029–33.
10. Diskin C., Palsson-McDermott E.M. Metabolic modulation in macrophage effector function. *Front Immunol.* 2018; 9: 270.
11. Tannahill G.M., Curtis A.M., Adamik J., Palsson-McDermott E.M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β beta through HIF-1 α . *Nature.* 2013; 496 (7444): 238–42.
12. Everts B., Amiel E., Huang S.C., Smith A.M. et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 2014; 15 (4): 323–32.
13. Cheng S.C., Quintin J., Cramer R.A., Shepardson K.M. et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science.* 2014; 345 (6204): 1250684.
14. Krawczyk C.M., Holowka T., Sun J., Blagih J. et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood.* 2010; 115 (23): 4742–9.
15. Meiser J., Kramer L., Sapcariu S.C., Battello N. et al. Pro-inflammatory macrophages sustain pyruvate oxidation through pyruvate dehydrogenase for the synthesis of itaconate and to enable cytokine expression. *J Biol Chem.* 2016; 291 (8): 3932–46.
16. Lampropoulou V., Sergushichev A., Bambouskova M., Nair S. et al. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell Metab.* 2016; 24 (1): 158–66.
17. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A. et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 2003; 300 (5625): 1584–7.
18. Chamailard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J. et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* 2003; 4 (7): 702–7.
19. Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., L'Vov V.L. et al. The dual NOD1/NOD2 agonism of muropeptides containing a meso-diaminopimelic acid residue. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160784.
20. Дагиль Ю.А., Арбатский Н.П., Алхазова Б.И., Львов В.Л. и др. Структурные особенности селективных и неселективных агонистов NOD-рецепторов. *Мед. иммунология.* 2017; (19): 705–14. [Dagil Yu.A., Arbatsky, N.P., Alkhazova, B.I., L'vov, V.L. et al. Structural features of selective and non-selective NOD receptor agonists. *Meditinskaya immunologiya [Medical Immunology].* 2017; (19): 705–14. (in Russian)]
21. Pashenkov M.V., Popilyuk S.F., Alkhazova B.I., L'Vov V.L. et al. Muropeptides trigger distinct activation profiles in macrophages and dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 2010; 10 (8): 875–82.
22. 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.

23. Rogatzki M.J., Ferguson B.S., Goodwin M.L., Gladden L.B. Lactate is always the end product of glycolysis. *Front Neurosci.* 2014; 9: 22.
24. Hahn E.L., Halestrap A.P., Gamelli R.L. Expression of the lactate transporter MCT1 in macrophages. *Shock.* 2000; 13 (4): 253–60.
25. John S., Weiss J.N., Ribalet B. Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose. *PLoS One.* 2011; 6 (3): e17674.
26. Miyamoto S., Murphy A.N., Brown J.H. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ.* 2008; 15 (3): 521–9.
27. Bain J., Plater L., Elliott M., Shpiro N. et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 2007; 408 (3): 297–315.
28. Jiang H., Shi H., Sun M., Wang Y. et al. PFKFB3-driven macrophage glycolytic metabolism is a crucial component of innate antiviral defense. *J. Immunol.* 2016; 197 (7): 2880–90.
29. Boyd S., Brookfield J.L., Critchlow S.E., Cumming I.A. et al. Structure-based design of potent and selective inhibitors of the metabolic kinase PFKFB3. *J. Med. Chem.* 2015; 58 (8): 3611–25.
30. Clem B.F., O'Neal J., Tapolsky G., Clem A.L. et al. Targeting 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) as a therapeutic strategy against cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2013; 12 (8): 1461–70.
31. Michelucci A., Cordes T., Ghelfi J., Pailot A. et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110 (19): 7820–5.
32. Cordes T., Wallace M., Michelucci A., Divakaruni A.S. et al. Immuno-responsive gene 1 and itaconate inhibit succinate dehydrogenase to modulate intracellular succinate levels. *J. Biol. Chem.* 2016; 291 (27): 14 274–84.
33. Mills E.L., Ryan D.G., Prag H.A., Dikovskaya D. et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature.* 2018; 556 (7699): 113–7.
34. Vergadi E., Ieronymaki E., Lyroni K., Vaporidi K. et al. Akt Signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization. *J. Immunol.* 2017; 198 (3): 1006–14.
35. Dietl K., Renner K., Dettmer K., Timischl B. et al. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J. Immunol.* 2010; 184 (3): 1200–9.
36. Hu K., Yang Y., Lin L., Ai Q. et al. Caloric restriction mimetic 2-Deoxyglucose alleviated inflammatory lung injury via suppressing nuclear pyruvate kinase M2-signal transducer and activator of transcription 3 pathway. *Front Immunol.* 2018; 9: 426.
37. Na Y.R., Gu G.J., Jung D., Kim Y.W. et al. GM-CSF induces inflammatory macrophages by regulating glycolysis and lipid metabolism. *J. Immunol.* 2016; 197 (10): 4101–9.
38. Miller E.S., Koebel D.A., Sonnenfeld G. The metabolic stressor 2-deoxy-D-glucose (2-DG) enhances LPS-stimulated cytokine production in mice. *Brain Behav Immun.* 1993; 7 (4): 317–25.
39. Wang A., Huen S.C., Luan H.H., Yu S. et al. Opposing effects of fasting metabolism on tissue tolerance in bacterial and viral inflammation. *Cell.* 2016; 166 (6): 1512–25.e12.
40. Millet P., Vachharajani V., McPhail L., Yoza B. et al. GAPDH binding to TNF- α mRNA contributes to posttranscriptional repression in monocytes: a novel mechanism of communication between inflammation and metabolism. *J. Immunol.* 2016; 196 (6): 2541–51.
41. Shutt D.C., O'Dorisio M.S., Aykin-Burns N., Spitz D.R. 2-deoxy-D-glucose induces oxidative stress and cell killing in human neuroblastoma cells. *Cancer Biol. Ther.* 2010; 9 (11): 853–61.

© Коллектив авторов, 2019

Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И.

Терапевтическое действие иммуномодулирующего пептида ТЕККРРЕТВЕРЕКЕ в экспериментальной модели индуцированного язвенного колита у мышей

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

В модели экспериментального язвенного колита, индуцированного сульфатом декстрана (DSS-колит) у лабораторных мышей, исследовали лечебное действие синтетического тетрадекапептида ТЕККРРЕТВЕРЕКЕ (действующее вещество иммуномодулирующего препарата гепон). Было показано, что экспериментальная терапия тетрадекапептидом достоверно снижает клинические проявления болезни: потерю веса, индекс активности болезни и патоморфологические проявления в толстом кишечнике. При анализе клеточного состава воспалительного инфильтрата толстой кишки методом проточной цитометрии установлено, что экспериментальная терапия тетрадекапептидом уменьшает количество нейтрофилов и моноцитов в ткани кишки. При этом содержание регуляторных Т-клеток в ткани кишки возрастает. Количественная оценка интенсивности транскрипции мРНК генов, связанных с воспалением, в ткани толстого кишечника при индуцированном экспериментальном колите у мышей показала, что экспериментальная терапия тетрадекапептидом снижает активность генов провоспалительных цитокинов *il-6*, *il-1 β* , *tnf- α* , но не влияет на транскрипцию гена противовоспалительного цитокина *tgf- β 1*. Полученные данные свидетельствуют, что иммуномодулирующий тетрадекапептид ТЕККРРЕТВЕРЕКЕ оказывает выраженный лечебный эффект при индуцированных язвенно-деструктивных поражениях кишечника у лабораторных мышей.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника; неспецифический язвенный колит; проточная цитометрия; цитокины; иммуномодулирующий тетрадекапептид

Статья поступила 11.03.2018. Принята в печать 16.05.2018.

Для цитирования: Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. Терапевтическое действие иммуномодулирующего пептида ТЕККРРЕТВЕРЕКЕ в экспериментальной модели индуцированного язвенного колита у мышей. Иммунология. 2019; 40 (1): 15–26. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11002.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulaukhanov R.I.

Therapeutic effect of the immunomodulating peptide ТЕККРРЕТВЕРЕКЕ in the experimental model of induced ulcerative colitis in mice

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

In the model of experimental ulcerative colitis induced by dextran sulfate (DSS-colitis) in laboratory mice, the therapeutic effect of the synthetic tetradecapeptide ТЕККРРЕТВЕРЕКЕ (the active substance of the immunomodulating drug Gepon) was studied. It has been shown that tetradecapeptide therapy significantly reduces the clinical manifestations of the disease: weight loss, disease activity index and pathological manifestations in the large intestine. The cellular composition of the inflammatory colon infiltrate by flow cytometry analyzing has been established that experimental tetradecapeptide therapy reduces the number of neutrophils and monocytes in the intestinal tissue. In this case, the number of regulatory T-cells in the intestinal tissue increases. Quantification of the mRNA of genes associated with inflammation in colon tissue of the mice with induced experimental colitis showed that tetradecapeptide therapy reduces the activity of the genes of proinflammatory cytokines *il-6*, *il-1 β* , *tnf- α* , but does not affect the transcription of the anti-inflammatory cytokine *tgf- β 1*. The obtained data indicate that the immunomodulating tetradecapeptide ТЕККРРЕТВЕРЕКЕ has a pronounced therapeutic effect in induced ulcerative-destructive bowel lesions in laboratory mice.

Keywords: IBD; DSS-colitis; intestinal inflammation; Flow cytometry; cytokines; Gepon

Received 11.03.2018. Accepted 16.05.2018.

For citation: Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulaukhanov R.I. Therapeutic effect of the immunomodulating peptide ТЕККРРЕТВЕРЕКЕ in the experimental model of induced ulcerative colitis in mice. Immunologiya. 2019; 40 (1): 15–26. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11002. (in Russian)

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Для корреспонденции
Атауллаханов Равшан Иноятович –
доктор медицинских наук,
профессор, руководитель отдела
иммунной биотехнологии
ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии» ФМБА России,
Москва, Россия
E-mail:
ravshan.ataullakhanov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

For correspondence
Ataulakhanov Ravshan I. – MD, PhD,
Professor, Head of the Department
of Immune Biotechnology,
NRC Institute of Immunology
FMBA, Moscow, Russia
E-mail:
ravshan.ataullakhanov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

Болезнь Крона и неспецифический язвенный колит являются основными широко распространенными воспалительными заболеваниями кишечника (IBD – Inflammatory bowel disease), характеризуются хроническим воспалением желудочно-кишечного тракта с чередующимися периодами рецидивов и ремиссий, требуют длительного фармакологического и/или хирургического лечения [1]. Изъязвление слизистой оболочки кишечника, обусловленное чрезмерно интенсивным хроническим воспалением, является основной особенностью IBD [2], схожие поражения наблюдаются при радиационных поражениях кишечника, возникающих при терапии опухолей, а также при хроническом ишемическом энтерите [3].

Разработка новых вариантов лечения с известным механизмом действия и высокой эффективностью является актуальной задачей.

В отечественной клинической практике при лечении язвенного колита успешно применяется иммуномодулятор гепон. При лечении гепоном дистальных форм неспецифического язвенного колита, устойчивого к стандартному лечению противовоспалительными препаратами, наблюдалось существенное улучшение клинической картины у 70% больных [4]. Успешное применение данного препарата отмечено при лечении язв слизистой желудка, двенадцатиперстной кишки и толстого кишечника [4, 5]. Однако, несмотря на успешное применение препарата гепон в клинической практике для лечения деструктивных и эрозивно-язвенных воспалительных заболеваний, механизмы заживляющего действия препарата оставались неизвестными.

Модель экспериментального колита у мышей C57BL/6, индуцированного натриевой солью сульфата декстрана (DSS), является популярной и адекватной моделью для поиска и тестирования новых методов лечения IBD [6]. DSS-индуцированный колит вызывает клинические изменения, характерные для воспалительных заболеваний кишечника: потеря веса, диарея, повреждение слизистой с образованием язв. Макро- и микроскопические изменения включают укорочение толстого отдела кишечника, инфильтрацию нейтрофилами, разрушение кишечных крипт, гиперплазию бокаловидных клеток, фиброз и изъязвление [6–8]. Патогенез DSS-индуцированного колита рассматривается как следствие разрушения эпителиального барьера, снижение пролиферации эпителиальных клеток и повышение проницаемости эпителиального барьера, вызванных нарушениями плотных контактов между эпителиальными клетками [9, 10]. Это приводит к проникновению антигенов содержимого кишечника в ткань и развитию мощного локального воспаления при участии резидентных иммунных клеток, таких как макрофаги [11, 12]. Это в свою очередь способствует миграции лейкоцитов в очаг поражения, опосредованной медиаторами воспаления [13].

Клетки врожденного иммунитета: нейтрофилы, эозинофилы, моноциты, макрофаги и дендритные клетки, – являются первой линией иммунной защиты –

они обеспечивают иммунные реакции на повреждение и/или проникновение патогенов [14].

Ранными участниками воспалительной реакции в ткани кишки являются нейтрофилы, а инфильтрация слизистой оболочки кишки полиморфно-ядерными лейкоцитами – это одна из характерных особенностей IBD [15], она связана с активным воспалением. Нейтрофилы определяют патогенез IBD с помощью различных механизмов: активное разрушение эпителиального слоя и прилежащих тканей путем окислительного и протеолитического повреждения [16] и поддержание воспаления через синтез провоспалительных медиаторов, таких как цитокины TNF- α , ИЛ-1 α , ИЛ-12, MIF, ИЛ-17, хемокины, ростовые факторы GM-CSF, M-CSF, G-CSF, медиаторы воспаления семейства HNP и гранулярные энзимы – эластаза, азуроцидин, липокалин [17]. Вместе с тем современные исследования функциональной активности инфильтрата кишки при IBD и в животных моделях указывают на гетерогенность популяции и способности нейтрофилов и моноцитов выступать в качестве регуляторов воспаления через продукцию цитокина TGF- β , а также синтез аргиназы [18, 19].

Макрофаги составляют наибольшую популяцию лейкоцитов в здоровой кишке и выполняют важнейшую функцию поддержания кишечного гомеостаза, включая фагоцитоз и деградацию микроорганизмов и апоптотических клеток ткани, а также синтез медиаторов, контролирующих обновление эпителия [20]. В зависимости от функциональных характеристик и спектра секретируемых цитокинов макрофаги подразделяют на классически активированные провоспалительные макрофаги M1 и альтернативно активированные иммунорегуляторные макрофаги M2 [12, 21]. В то же время часть исследователей рассматривает эти типы макрофагов как различные функциональные состояния [14, 22]. В здоровой ткани кишки макрофаги проявляют состояние анергии, не производят провоспалительные цитокины, однако они способны к активному фагоцитозу и выполняют функции «мусорщиков» [23]. Однако при патологии функциональные характеристики макрофагов изменяются. Так, было показано, что у пациентов с болезнью Крона макрофаги кишки производят большое количество провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-23 и TNF- α и влияют на увеличение синтеза IFN- γ T-клетками [24]. В другом исследовании было показано, что у больных с болезнью Крона нарушена секреция провоспалительных цитокинов макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови в ответ на стимуляцию *E. coli* и агонистами TLRs (toll-like receptors – рецепторы распознавания образов патогенов) [25].

Предшественниками макрофагов в кишке являются моноциты Ly6C^{hi}/CCR2⁺ как в здоровой кишке, так и при воспалении, однако при воспалении снижается количество резидентных тканевых макрофагов фенотипа MHCII^{hi}/CX3CR1^{hi} и увеличивается количество провоспалительных макрофагов MHCII^{hi}/CX3CR1^{int}, отвечающих на стимуляцию TLR [26].

Дендритные клетки в кишке представляют собой гетерогенную популяцию [27]. Основная функция этих клеток состоит в мониторинге окружающей микро-среды, захвате антигенов и реализации последующих иммунных событий, связанных с воспалительным ответом или иммунотолерантностью. Эта двойная функция дендритных клеток реализуется через взаимодействия врожденного и адаптивного иммунитета [27]. В здоровой кишке дендритные клетки отвечают за поддержание гомеостаза через взаимодействие с эпителиальными клетками и под действием стромального лимфопротейна (thymic stromal lymphopoietin – TSLP) поляризуют Т-клетки по Th2-пути [28]. При воспалительных заболеваниях кишечника наблюдается радикальное снижение уровня экспрессии мРНК TSLP клетками кишечного эпителия, что в свою очередь приводит к изменению функционального состояния дендритных клеток и способствует развитию воспаления [28]. Также при язвенном колите и болезни Крона наблюдается повышение уровней TLR2 и TLR4, коактивационных молекул CD40 и продукции цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-6 в дендритных клетках кишечника в сравнении со здоровым контролем, что отражает активированное состояние, связанное с воспалением [29].

Эозинофилы кишки могут составлять до 30% миелоидных клеток в ткани здоровой кишки, они являются важными участниками поддержания гомеостаза [26]. Миграция эозинофилов в ткань кишки определяется хемотаксисом CCR3 CCL11 (эотаксин 1) [30] и взаимодействием $\alpha 4\beta 7$ интегрина с MAdCAM1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) [31]. Наибольшее количество эозинофилов присутствует в двенадцатиперстной кишке, более того, эозинофилы присутствуют в кишке плода, и их количество увеличено или соответствует норме у мышей в стерильных условиях, что свидетельствует как об их важной регуляторной роли в норме, так и об участии в воспалительных реакциях [32]. Недавние исследования указывают на участие эозинофилов в переключении IgA в пейеровых бляшках и поддержании пула IgA⁺-плазматических клеток, CD103⁺-дендритных клеток и FOXP3⁺-регуляторных Т-клеток в ткани кишки. Участие эозинофилов в поддержании гомеостаза в ткани кишки может быть связано с их способностью к производству цитокина TGF- β [33].

Адаптивный иммунитет выполняет важную функцию контроля и реализации воспалительных реакций в ответ на патогены, а также принимает участие в поддержании гомеостаза в кишечнике. Эффекторные Т-клетки являются пластичной популяцией, и направление их дифференцировки определяется внешними стимулами микроокружения [34], в том числе в патогенезе IBD [14]. Адаптация к потребностям организма при изменении условий, таких как возраст, диета, ксенобиотики или микроорганизмы, обуславливает иммунный гомеостаз, тогда как нарушение контроля этих реакций приводит к необратимым изменениям и развитию хронического воспаления и аутоиммунных реакций [35]. Регуляторные Т-клетки необходимы для развития

иммунной толерантности к антигенам и аутоантигенам, что является, несомненно, важной функцией поддержания гомеостаза в барьерных тканях, таких как слизистая кишечника [36]. Нарушения функций регуляторных Т-клеток приводят к развитию аутоиммунных и хронических воспалений, включая IBD [37]. Т-регуляторные клетки обнаруживаются в слизистой оболочке кишки, их количество увеличивается при воспалении, а в мышинной модели колита регуляторные Т-клетки подавляют развитие воспаления [38]. Роль регуляторных Т-клеток в патогенезе IBD до конца не определена [37]. В активной фазе воспаления при IBD количество регуляторных Т-клеток в периферической крови уменьшается [39], однако в ткани кишки эта популяция численно увеличивается и проявляет иммуносупрессивные свойства *in vitro* [39]. Предполагается, что их регуляторный потенциал недостаточен для контроля воспаления при IBD и это позволяет рассматривать патогенез IBD как следствие нарушения супрессорных функций [40]. Ряд стратегий терапевтических подходов направлен на усиление функций регуляторных Т-клеток, в том числе на применение клеточной терапии регуляторными Т-клетками при воспалительных заболеваниях кишечника [41]. Это находит подтверждение в том, что блокирование TNF увеличивает количество регуляторных Т-клеток у детей с болезнью Крона [42], увеличивает иммуносупрессивные функции этих клеток [43], а также уменьшает апоптоз CD4⁺/FoxP3⁺-Т-клеток в слизистой оболочке больных в активной фазе IBD [44].

В развитии и регуляции воспаления в ткани кишки задействовано большое количество цитокинов, ростовых факторов и других растворимых медиаторов [45]. Роль отдельных молекул и их взаимодействие с клеточными мишенями, а также сигнальные пути, задействованные в этих процессах, являются целью большого количества исследований и предметом для поиска новых лекарственных препаратов для лечения IBD [45]. Ключевая роль TNF- α в развитии патогенеза воспалительных заболеваний кишечника хорошо описана [46], увеличение продукции этого цитокина в ткани кишки при воспалении показана для большинства животных моделей, а также для пациентов с IBD. Повышение продукции этого цитокина описано для моноцитов, макрофагов, фибробластов, Т-клеток [47], гранулоцитов [48]. Активация сигнальных каскадов TNF при колите приводит к плейотропным провоспалительным эффектам, включающим направленную миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, усиленный ангиогенез, гибель клеток Панета, увеличение синтеза металлопротеиназ миофибробластами, активацию макрофагов и эффекторных Т-клеток, а также прямое повреждение эпителиальных клеток через активацию киназы MLCK [45, 49, 50]. Другим ключевым медиатором воспаления кишечника при IBD является цитокин ИЛ-1 β , для патогенеза воспалительных заболеваний кишечника характерно локальное и системное повышение уровня этого цитокина. Основными продуцентами этого цитокина при воспалении кишечника являются моноциты, макрофаги и нейтрофилы,

а также клетки эпителия и фибробласты. Связывание рецептора этого цитокина запускает активацию NF- κ B сигнального пути, что приводит к выработке спектра провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , ИЛ-6, ИЛ-12 [45]. Выработка этого цитокина эпителиальными клетками повышает инфильтрацию нейтрофилов и моноцитов в ткань кишки при воспалении. Цитокин ИЛ-6 в ткани кишки синтезируется макрофагами, фибробластами и Т-клетками. Этот цитокин активирует белки острой фазы, Т-клетки и защищает от апоптоза, индуцирует пролиферацию эпителия [45]. Цитокин TGF- β играет особую роль в кишечнике, это опосредовано его широким диапазоном действия и вовлеченности во многие процессы, в том числе обновление эпителия, пролиферацию эпителиальных и мезенхимальных компонентов кишечной стенки, а также мощную иммунорегуляторную активность, необходимую для развития толерантности и поддержания гомеостаза [51]. При IBD описано увеличение продукции TGF- β в ткани кишки, а также развитие фиброза кишки [52]. Предполагается, что снижение регуляторной функции TGF- β , несмотря на высокий уровень продукции, связано с нарушением сигнальных механизмов SMAD-пути. Так, было показано, что при IBD возрастает количество ингибирующей субъединицы SMAD7, что приводит к нарушению сигналинга и снижению экспрессии целевых генов [53].

Данная работа посвящена изучению лечебного эффекта иммуномодулирующего тетрадекапептида ТЕККРРЕТВЕРЕКЕ в экспериментальной модели язвенно-деструктивного колита у лабораторных мышей. Влияние препарата изучено на уровне псевдоклинических проявлений язвенного колита (диарея, кровавый стул, потеря веса), патоморфологических изменений кишечника (укорочение толстой кишки, макроскопические язвы, рубцовые стриктуры кишечника), а также клеточных и молекулярных характеристик воспалительной реакции в ткани толстой кишки.

Методика

Мыши – самцы C57BL/6 в возрасте 8–10 нед (21–23 г) содержались в стандартных условиях вивария, были распределены случайным образом в группы по 15 животных.

Декстран-индуцированный колит получали пероральным введением 2,5% раствора сульфата декстрана [DSS (M.W. 35–50 kDa, Cat N 160110, MP Voimedicals, LLC, France)] в питьевой воде в 1–5-й, 11–16-й дни в поилках постоянно, в соответствии с рекомендованными протоколами [7, 54, 55]. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с правилами работы с животными, утвержденными комиссией по этическому отношению к животным ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Одновременно с началом первого цикла декстрана вводили тетрадекапептид внутрибрюшинно каждые 48 ч в дозе 50 мкг/мышь, контрольная группа получала аналогичный объем растворителя (рис. 1, А). Индекс активности

болезни (disease activity index – DAI) оценивали для каждой мыши ежедневно на основании описанных протоколов для этой модели [55, 56]. DAI оценивали для каждой мыши ежедневно, исходя из трех параметров: потери веса, консистенции стула и ректального кровотечения. Каждый параметр оценивали по 4-балльной шкале от 0 до 4, баллы для каждого показателя суммировали, максимальное значение индекса соответствует 12. Наличие скрытой крови в фекалиях определяли бензидиновой реакцией, как описано в протоколах [57]. На 9-й и 19-й дни эксперимента проводили анализ морфологических и иммунологических изменений в ткани кишки без лечения и с лечением тетрадекапептидом.

Выделение мононуклеарных клеток из ткани кишки мыши. Вскрывали брюшную полость, кишку отсекали по вхождению тонкой в слепую, перерезали лобковую кость (*os pubis*) и извлекали прямую кишку. Фотографировали кишку на белой бумаге с линейкой. Отсекали слепую кишку и переносили кишку в чистую чашку Петри (10 см) на лед в холодный PBS. Зажимали конец прямой кишки плоским пинцетом и промывали шприцем с иглой содержимое кишечника 20 мл холодного PBS. Переносили промытую кишку в новую чашку Петри (10 см) с 5 мл холодного PBS, разрезали кишку вдоль ножницами (на холоду), раскрывали и скальпелем разрезали вдоль на 2 равные части. Половину переносили в отдельную пробирку на 1,5 мл с 0,5–1 мл RNA later (Qiagen, Германия, Кат. № 1018187), и оставляли при 4 °C на 16 ч, затем хранили при –20 °C (см. описание ПЦР). Вторую половину кишки переносили в чашку Петри (6 см) с 5 мл HBSS с 5 mM EDTA и 1 mM β -mercaptoethanol при 37 °C (pre-digestion solution), разрезали ножницами на кусочки 0,5 мм, собирали в пробирку на 50 мл. Остатки из чашки Петри смывали 5 мл буфера и ставили горизонтально на шейкер (качалку, высокие обороты) на 20 мин при 37 °C. Откручивали 5 мин 1200 об/мин, убирали супернатант и отмывали 30 мл 1×HBSS 10 мин 1200 об/мин. Измельчали скальпелем на более мелкие кусочки (1 мм) и помещали в 4 мл раствора коллагеназы в среде RPMI [коллагеназа I типа – 0,2 мг/мл (Кат. № C0130, Sigma), коллагеназа IV типа – 1 мг/мл (Кат. № 17104, Gibco)], содержащий ДНКазу I – 0,02 мг/мл (D4527-10KU, Sigma), 10 мкг/мл гентамицина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Пробирку с раствором ферментов и тканью ставили горизонтально на шейкер (качалку, высокие обороты) на 1 ч при 37 °C. После инкубации суспензию переносили в новую пробирку на 50 мл, добавляли 15 мл PBS/BSA (0,5%), пипетировали и пропускали через нейлоновое ситечко для ткани на 100 мкм, промывая ситечко 15 мл PBS/BSA. Затем откручивали 15 мин при 1500 об/мин 4 °C, суспензию разводили в 10 мл PBS/BSA и пропускали через ситечко на 70 мкм, откручивали 10 мин, 1500 об/мин при 4 °C. Выливали супернатант и осадок рессуспендировали в 300 мкл PBS/BSA. После чего проводили окрашивание суспензии клеток антителами.

Проточная цитофлуориметрия. Из суспензии клеток отбирали пробу 30 мкл и разводили 1:1 в растворе антител. Использовали 2 набора антител. Смесь антител № 1 включала CD45-Alexa Fluor 488 (1:1000), CD3e-PE-CF594 (1:500), I-A/I-E-APC/Cy7 (1:1000), CD4-PerCP/Cy5.5 (1:1000), CD8a-Brilliant Violet 510 (1:1000); CD62L-PE (1:1000); CD44-PE/Cy7 (1:1000); CD25-APC (1:1000) смесь антител № 2 включала CD45-Alexa Fluor 488 (1:1000), CD11b-Brilliant Violet 510 (1:1000), Ly-6c-PE (1:1000), CD11c-PE/Dazzle594 (1:1000), Ly-6G-PE/Cy7 (1:1000), F4/80-APC (1:1000), I-A/I-E-APC/Cy7 (1:1000). Все антитела производства Biotend, США. Суспензию клеток с антителами инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Затем клетки отмывали в 1 мл холодного буфера 10 мин, 1200 об/мин при 4 °С. Супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в 400 мкл холодного буфера, содержащего DAPI (1,25 мкг/мл) и калибровочные шарики 10⁴/мл (Fluorospheres 2% bright, размер 10.15 мкм, Epics division of coulter corp, Hialeah, США), и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Aria II.

На первом этапе выделяли популяцию CD45⁺ живых клеток в канале DAPI и CD45, потом исключали агрегаты клеток, затем по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию отсекали дедбрис, далее выделяли отдельные популяции в соответствии с их фенотипом, как это описано в протоколах [58–62]. Популяцию нейтрофилов определяли как Ly6G^{hi}/Ly6c^{int}/F4/80-/11b⁺, популяцию моноцитов Ly6G-/Ly6c^{hi}/F4/80-, популяцию макрофагов CD11b⁺/Ly6C-/Ly6G-/F4/80⁺/SSC^{lo}, популяцию эозинофилов, несущих различные катионные гранулы, определяли как CD11b⁺/Ly6C-/Ly6G-/F4/80⁺/SSC^{hi}; в популяции CD3⁺-клеток выделяли CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки, популяцию Т-регуляторных клеток определяли из CD4⁺ как CD44^{hi}/CD62L-/CD25^{hi}. В каждом образце просчитывали 0,6–1,0·10⁶ событий. Анализ данных проводили в программах FACS-Diva 6 (BD Biosciences) и Cytobank.

Подсчет клеток. Для подсчета абсолютного количества клеток в образце в канале прямого и бокового светорассеяния выделяли область калибровочных шариков и клеток, определяя их количество в проанализированном образце. Далее вычисляли концентрацию исследуемой популяции клеток (X млн/мл) в образце по формуле (1):

$$X = \frac{A \cdot C \cdot V2}{B \cdot V1}, \quad (1)$$

где *A* – количество проанализированных клеток исследуемого образца, единиц; *V1* – объем суспензии клеток исследуемого образца с антителами, мкл; *B* – количество проанализированных калибровочных шариков в образце, единиц; *C* – концентрация калибровочных шариков в исходной суспензии, млн/мл; *V2* – объем добавляемого раствора с калибровочными шариками, мкл.

Зная концентрацию клеток в исследованном образце и объем всего образца, рассчитывали абсолютное количество клеток отдельных популяций в кишке.

ПЦР в режиме реального времени. Выделение РНК из ткани кишки проводили, используя набор для выделения РНК РНК-экстран (Синтол, Россия), согласно инструкции производителя. Кратко: ½ кишки после выделения помещали в пробирку с 1 мл RNA-later (Qiagen, Германия, Кат. № 1018187) и оставляли при 4 °С на ночь, затем хранили при –20 °С. Перед выделением ткань доставали из пробирки стерильным пинцетом, фильтровальной бумагой убирали остатки жидкости и немедленно переносили в фарфоровую чашку с жидким азотом, ткань размельчали фарфоровым пестиком, по необходимости доливая жидкий азот, чтобы она не размораживалась. После размельчения ткани до пудры срезанным носиком или обратным концом срезанной пастеровской пипетки, охлажденной предварительно в азоте, образец переносили в пробирку с 600 мкл RTL-буфера [RNeasy mini kit (Qiagen, Германия, Кат. № 74104)] (пробирки предварительно взвешивали с точностью до 0,001 г). Пробирку интенсивно встряхивали на вортексе, чтобы весь образец был лизирован. После этого образец взвешивали. Далее шприцом на 5 мл и иглой 22G гомогенизировали образец до однородного состояния. В новую пробирку переносили 10–20 мкг образца, добавляли лизирующий буфер с гуандин-изотиоционатом (набор для выделения РНК «РНК-экстран» («Синтол», Россия), прогревали 15 мин при 65 °С. Далее выделяли РНК согласно протоколу («Синтол»), осадок растворяли в 40 мкл mQ, обработанной ингибитором рибонуклеаз – диэтилпирикарбонатом DEPC (diethyl pyrocarbonate). После выделения РНК, дополнительно проводили обработку ДНКазой, используя коммерческий набор (Кат. № EN0521, Thermo Scientific). Для этого к 40 мкл раствора нуклеиновых кислот добавляли 4 мкл 10× буфера для ДНКазы с MgCl₂ и 4 мкл ДНКазы 1 ед/мкл, инкубировали 30 мин при 37 °С. После чего проводили переосаждение РНК в присутствии хлорида лития, согласно существующему протоколу [63]. К раствору РНК на льду добавляли 152 мкл mQ, свободной от РНКаз и ДНКаз, и 20 мкл 8M LiCl, инкубировали на льду в течение 2 ч, осаждали центрифугированием 30 мин при 14 000 об/мин, 4 °С, убирали супернатант. Осадок растворяли в 200 мкл mQ, добавляли 20 мкл 8M LiCl, повторно инкубировали на льду в течение 2 ч, осаждали центрифугированием 30 мин при 14 000 об/мин, 4 °С, убирали супернатант. Осадок растворяли в 200 мкл mQ, добавляли 20 мкл 3M ацетата Na и 400 мкл этанола (96,6%), инкубировали 30 мин при –20 °С, осаждали центрифугированием 30 мин при 14 000 об/мин, 4 °С, убирали супернатант. Осадок промывали 70% этанолом 10 мин при 14 000 об/мин, 4 °С, убирали супернатант и РНК растворяли в 20 мкл mQ, обработанной DEPC. Реакцию обратной транскрипции проводили в 50 мкл, используя коммерческий набор (Кат. № OT-1, Синтол, Россия), согласно инструкции произ-

водителя. Перед проведением обратной транскрипции выполняли отжиг праймеров 5 мин при 65 °С. В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали Random-primers, 15 ОЕ/мл Random6 (2 мкл на 20 мкл раствора РНК). После отжига образец немедленно помещали на лед, после охлаждения добавляли 20 мкл 2,5× буфера для обратной транскрипции и 2 мкл раствора ревертазы (50 е.а./мкл). Реакцию осуществляли в термостате «Гном» (ДНК-Технология, Россия), 40 мин при 40 °С и 10 мин при 95 °С. После реакции обратной транскрипции к 50 мкл исходного образца добавляли 150 мкл mQ. В реакцию ПЦР добавляли 5 мкл кДНК, для каждой системы генов реакцию ставили в дублях. ПЦР в режиме реального времени проводили в 25 мкл (в реакцию добавляли 14 pM каждого праймера, 3 pM зонда, 2,5 е.а. *SynTaq* ДНК-полимеразы, концентрация $MgCl_2$ 2,5 mM, DNTPs – 0,25 mM). Для детекции флуоресценции использовали специфичные зонды Taq-man с меткой FAM. Последовательности праймеров и зондов приведены в табл. 1.

Амплификацию проводили на приборе «DTprime-4» («ДНК-технология», Россия), программа включала прогрев и инактивацию блокирующих полимеразу антител при 94 °С (5 мин) и температурное циклирование: 94 °С (10 сек), 62 °С (20 сек) и 72 °С (5 сек) (40 циклов). На каждом цикле при 62 °С осуществлялась автоматическая детекция флуоресценции в канале FAM. Значение экспрессии мРНК каждого исследованного гена вычисляли относительно гена β -actin, используя метод $\Delta\Delta C_p$ [64, 65].

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism v.6. Для экспериментального колита сравнивали группы с лечением и без лечения с использованием *U*-критерия Манна-Уитни.

Результаты

Терапия тетрадекапептидом снижает индекс активности болезни и патологические изменения толстой кишки в модели язвенного колита. Экспериментальная схема исследования приведена на рис. 1, А. В течение первого цикла индуцированного декстраном колита (1–5-й дни) начальные признаки развития заболевания наблюдали у отдельных мышей на 3-й день (положительная реакция в тесте на скрытую кровь в фекалиях, понос), на 4–5-й день у всех мышей наблюдали признаки развития колита: потерю веса, ректальное кровотечение, диарею. Как следует из анализа динамики индекса активности болезни, представленного на рис. 1, В (кривая динамики без лечения – DSS), пик развития признаков колита констатировали на 6-е сутки. При повторном цикле применения декстрана (11–16-й дни) наблюдали возобновление признаков колита. При терапии тетрадекапептидом в первом цикле применения DSS картина развития заболевания была схожей с группой без лечения, и достоверных различий в потере веса между группами не обнаружено (рис. 1, Б). Лечение тетрадекапептидом при повторном цикле колита значительно сокращало потерю веса и способствовало быстрому восстановлению массы тела животных, тогда как в группе без лечения потеря веса продолжалась до 16-го дня и восстановления не было (рис. 1, Б). Достоверные различия в DAI были обнаружены на 7, 18 и 19-й дни. Смертность животных не отличалась в группах с лечением и без лечения – составила 25%.

Можно констатировать, что положительное влияние терапии тетрадекапептидом на течение DSS-колита статистически значимо проявлялось в фазе восстановления после второго цикла применения DSS (17–18-й дни) и характеризовалось нормализацией показателей

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов

Название гена	Последовательность олигонуклеотидов 5'-3'	Код последовательности в базе NCBI
<i>il-1β</i>	(forward) caaccaacaagtgatattctccatg (reverse) gatccacactctccagctgca (probe) FAM-ctgtgtaatgaaagacggcacaccacc-RTQ	NM_008361.4
<i>il6</i>	(forward) gaggataccactcccaacagacc (reverse) aagtgcacatcgtgttcataca (probe) FAM- cagaattgccattgcacaactcttttca -RTQ	NM_031168.2
<i>tnf-α</i>	(forward) catcttctcaaaatcgagtgacaa (reverse) tgggagtagacaaggtacaacc (probe) FAM- cacgtcgtagcaaacaccacaagtgga -RTQ	NM_013693.3
<i>tgf-β1</i>	(forward) tgacgtcactggagtgtacgg (reverse) ggftcatgtcatggatgggtc (probe) FAM-ttcagcgtcactgctcttgtgacag-RTQ	NM_011577
β -actin	(forward) agagggaatcgtgcgtgac (reverse) caatagtgatgacctggccgt (probe) FAM-cactgccgcatcctctctccc-RTQ	NM_007393

веса, восстановлением нормального функционирования кишечника (отсутствие диареи) и снижением индекса активности болезни.

Морфологические изменения толстого отдела кишечника исследовали на 9-й и 19-й дни развития колита. На рис. 1, Г представлены фотографии толстого отдела кишечника и слепой кишки, полученные после вскрытия животных на 19-й день наблюдений. Как следует из графика сравнения среднего значения длины толстой кишки по группам (рис. 1, Д), при колите наблюдается существенное укорочение кишки как после первого цикла декстрана ($6,7 \pm 0,2$ см), так и после второго ($6,8 \pm 0,3$ см) относительно контрольной группы ($9,2 \pm 0,4$ см). Экспериментальная терапия тетрадекапептидом уменьшает укорочение кишки, вызванное колитом: так, длина кишки в группе леченых животных составила $7,6 \pm 0,6$ и $8,5 \pm 0,9$ см после первого и второго циклов отравления сульфатом декстрана, соответственно. Как следует из графика, пред-

ставленного на рис. 1, Д, после второго цикла отравления DSS терапия тетрадекапептидом достоверно уменьшает укорочение кишки, вызванное колитом. Важно отметить, что толстая кишка у мышей с нелеченым DSS-колитом пуста, комочков проходящей пищи нет, т. е. толстый кишечник поражен настолько, что его функционирование полностью нарушено. Напротив, у мышей с DSS-колитом, получавших лечение тетрадекапептидом, в кишечнике наблюдаются сформированные фекалии, как и в кишечнике интактных контрольных животных. Иначе говоря, лечение тетрадекапептидом мышей с DSS-колитом восстановило функционирование толстого кишечника.

Экспериментальная терапия тетрадекапептидом изменяет состав клеточных популяций в воспалительном инфильтрате в ткани толстой кишки в модели язвенного колита. Через 9 и 19 дней после начала индукции DSS-колита у экспериментальных

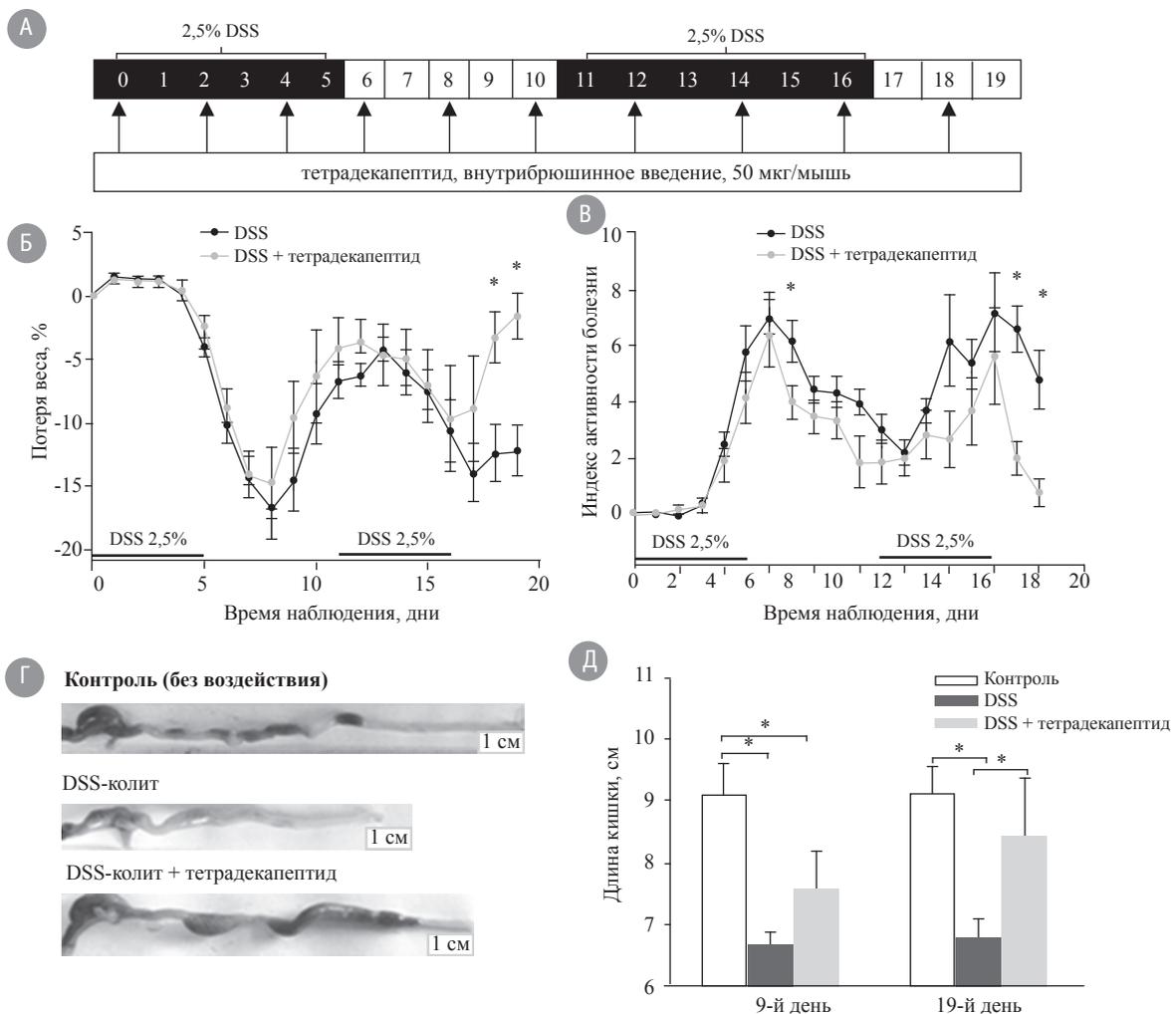


Рис. 1. Схема получения экспериментального язвенного колита (А) и влияние терапии тетрадекапептидом в модели колита на потерю веса (Б), индекс активности болезни (В) и макроскопические изменения кишки (Г) после одного цикла назначения DSS (9-й день) и после двух циклов (19-й день) в группах без лечения и при терапии тетрадекапептидом; анализ длины толстого отдела кишечника при экспериментальном колите в группе без лечения и при терапии тетрадекапептидом (Д) На графиках представлено среднее по группам (\pm st.dev.); * - $p < 0,05$.

Таблица 2. Результаты FACS-анализа клеточного состава популяций в ткани кишки в модели колита и при экспериментальной терапии тетрадекапептидом

Популяция клеток	Контроль (интактные)	DSS-колит (9-й день)	DSS-колит+ лечение i.p. (9-й день)	DSS-колит (19-й день)	DSS-колит+ лечение i.p. (19-й день)
	Средние значения числа клеток на кишку (\pm st. dev.)				
CD45 ⁺ -лейкоциты	235945 \pm 93320	2081621 \pm 402858	1408969 \pm 657093	1974985 \pm 498795	1174303* \pm 188737
LybG ⁺ -нейтрофилы	3011 \pm 791	252733 \pm 163439	56480 \pm 60361	139666 \pm 89720	60127* \pm 22245
LybC ⁺ -моноциты	14149 \pm 5421	267182 \pm 158132	77897 \pm 61361	190801 \pm 95844	80740* \pm 7948
F4/80 ⁺ /SSC ^{lo} -макрофаги	11782 \pm 3205	101376 \pm 82049	Нет данных	111829 \pm 49462	65620 \pm 24166
F4/80 ⁺ /SSC ^{hi} -эозинофилы	4705 \pm 2489	49590 \pm 36040	Нет данных	53494 \pm 49279	29558 \pm 10386
CD4 ⁺ -Т-клетки	41115 \pm 20788	145303 \pm 41976	100717 \pm 35690	151424 \pm 46737	143377 \pm 52024
CD8 ⁺ -Т-клетки	29669 \pm 9756	90680 \pm 23239	62224 \pm 28802	38488 \pm 15409	77974 \pm 39323
CD4 ⁺ CD62 ⁻ CD25 ⁺ -регуляторные Т-клетки	1674 \pm 795	13427 \pm 6913	13128 \pm 5051	6775 \pm 2665	12856* \pm 5604

Примечание. В таблице приведены средние значения по группе ($M \pm t$); * – достоверные различия в группе с лечением тетрадекапептидом относительно группы без лечения.

мышей, получавших и не получавших лечение тетрадекапептидом, мы изучили состав клеточных популяций в иммунном инфильтрате в ткани толстой кишки. Методом проточной цитометрии исследовали содержание CD45⁺-лейкоцитов, LybG⁺-нейтрофилов, LybC⁺-моноцитов, F4/80⁺-макрофагов, эозинофилов, CD4⁺-Т-клеток, CD8⁺-Т-клеток и CD4⁺CD62⁻CD25⁺-регуляторных Т-клеток. Среднее значение абсолютного количества каждой проанализированной популяции в ткани толстой кишки приведено в табл. 2.

В модели язвенного колита наблюдали существенное увеличение количества CD45⁺-лейкоцитов в ткани кишки (рис. 2, А). Абсолютное количество CD45⁺-клеток в ткани кишки в контрольной группе составило $0,2 \pm 0,09$ млн, а при воспалении, вызванном DSS, это значение увеличилось на порядок и составило $2,1 \pm 0,4$ млн на 9-й день и $2,0 \pm 0,4$ млн на 19-й день. Увеличение числа CD45⁺-лейкоцитов в ткани кишки при терапии тетрадекапептидом было меньше в 1,5–2 раза по сравнению с группой без лечения и составило $1,4 \pm 0,6$ млн и $1,2 \pm 0,2$ млн на 9-й и 19-й дни соответственно. Отличия в группах с лечением и без лечения на 19-й день были статистически значимыми.

Было установлено, что при экспериментальном колите в ткани кишки увеличивается абсолютное количество всех проанализированных клеток: нейтрофилов,

моноцитов, макрофагов, эозинофилов, CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток (см. табл. 2).

При исследовании популяций Т-клеток обнаружено, что при колите увеличивается инфильтрация ткани как эффекторными CD4⁺-Т-клетками, так и цитотоксическими CD8⁺-Т-клетками; терапия тетрадекапептидом не оказывала влияния на количественное содержание этих клеточных популяций (см. табл. 2).

Установлено, что при экспериментальном колите увеличивается абсолютное содержание популяции регуляторных Т-клеток в ткани кишки в обеих временных точках наблюдения. На 19-й день наблюдения количество регуляторных Т-клеток было достоверно выше в группе, получавшей терапию тетрадекапептидом, по сравнению с группой без лечения (рис. 2, Б).

Абсолютное количество LybG⁺-нейтрофилов в толстой кишке интактных мышей составило $3,0 \pm 0,7$ тыс. клеток, тогда как у мышей с DSS-колитом это значение увеличивалось до $140,0 \pm 89$ тыс. на 19-й день наблюдения. Лечение тетрадекапептидом снижало количество LybG⁺-нейтрофилов в воспаленной кишке вдвое – до $60,1 \pm 22$ тыс. клеток на кишку ($p < 0,05$) (рис. 2, В). Абсолютное количество моноцитов (LybC⁺) в контрольной кишке составило $14,1 \pm 5,4$ тыс. клеток, при колите увеличивалось до $190,8 \pm 95,8$ тыс. на 19-й день наблюдений, а при лечении тетрадекапептидом достоверно

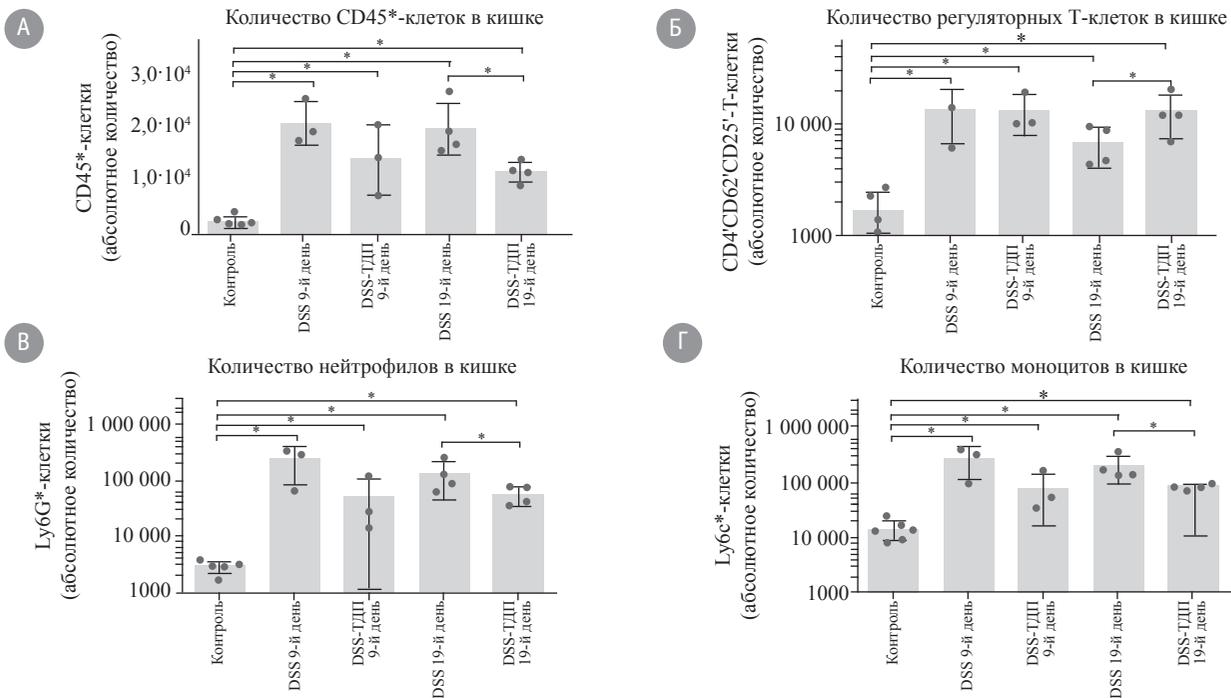


Рис. 2. Абсолютное количество CD45⁺-лейкоцитов (А), регуляторных Т-клеток (Б), LybG⁺-нейтрофилов (В) и LybC⁺-моноцитов (Г) в ткани кишки при развитии экспериментального колита и влияние терапии тетрадекапептидом (ТДП); * – $p < 0,05$

($p < 0,05$) снижалось до $80,7 \pm 7,9$ тыс. клеток на кишку (рис. 2, Г). Для макрофагов и эозинофилов было обнаружено увеличение абсолютного количества клеток при индуцированном колите, однако при лечении тетрадекапептидом изменения этих показателей не наблюдали (см. табл. 2).

Представленные данные свидетельствуют о том, что терапия тетрадекапептидом достоверно уменьшала инфильтрацию ткани кишки LybG⁺-нейтрофилами и LybC⁺-моноцитами. Одновременно при лечении тетрадекапептидом у мышей с DSS-индуцированным колитом повышалось содержание регуляторных Т-клеток в ткани толстой кишки. Это указывает на то, что при терапии тетрадекапептидом у мышей с тяжелым деструктивным колитом наблюдается уменьшение интенсивности воспалительных реакций в кишке.

Экспериментальная терапия тетрадекапептидом снижает уровень провоспалительных цитокинов в ткани кишки, но не влияет на экспрессию противовоспалительных цитокинов при DSS-индуцированном колите. При развитии экспериментального колита, индуцированного сульфатом декстрана, в ткани кишки происходило значительное увеличение продукции провоспалительных медиаторов. Основными цитокинами, связанными с воспалительными процессами в ткани кишки, являются ИЛ-1 β , ИЛ-6, TNF- α . На 9-й и 19-й дни после начала отравления мышей сульфатом декстрана относительная экспрессия мРНК гена *il-1 β* в стенке пораженной колитом толстой кишки увеличивалась в $11,6 \pm 1,3$ ($p < 0,05$) и $17,9 \pm 2,4$ ($p < 0,05$) раза соответственно, по сравнению с уров-

нем продукции этого цитокина в ткани толстой кишки здоровых мышей. Аналогично в стенке воспаленной кишки у мышей с DSS-колитом интенсивность транскрипции *il-6* в указанные дни была в 47 ± 10 ($p < 0,05$) и 30 ± 13 ($p < 0,05$), *tnf- α* – в $2,4 \pm 0,6$ ($p < 0,05$) и $2,8 \pm 0,4$ ($p < 0,05$) раза выше, чем в ткани толстой кишки интактных мышей (рис. 3, А–В).

Одновременно с усиленной продукцией провоспалительных медиаторов повышалась и интенсивность транскрипции гена противовоспалительного фактора *tgf- β 1* и была выше, чем в толстой кишке здоровой мыши в 2,5 раза ($p < 0,05$) (рис. 3, Г).

Инъекционное введение тетрадекапептида мышам, у которых индуцировали DSS-колит, приводило к существенному снижению продукции факторов воспаления в ткани толстой кишки. Под влиянием терапии тетрадекапептидом на 9-й и 19-й дни соответственно интенсивность транскрипции мРНК гена *il-1 β* снизилась в 1,7 и в 6,1 раза ($p < 0,05$), *il-6* – в 3,8 и 5,6 раз ($p < 0,05$), *tnf- α* – в 1,6 и в 1,7 раза ($p < 0,05$) (рис. 3).

Интенсивность продукции мРНК противовоспалительного цитокина *tgf- β 1* при лечении тетрадекапептидом имела тенденцию к снижению, но достоверного отличия от контроля (без лечения тетрадекапептидом) не достигала (рис. 3, Г).

Обсуждение

Индукция экспериментального колита сульфатом декстрана моделирует развитие воспаления в ткани кишки и вызывает в ней ряд характерных для колита макроскопических и микроскопических изменений [11, 66].

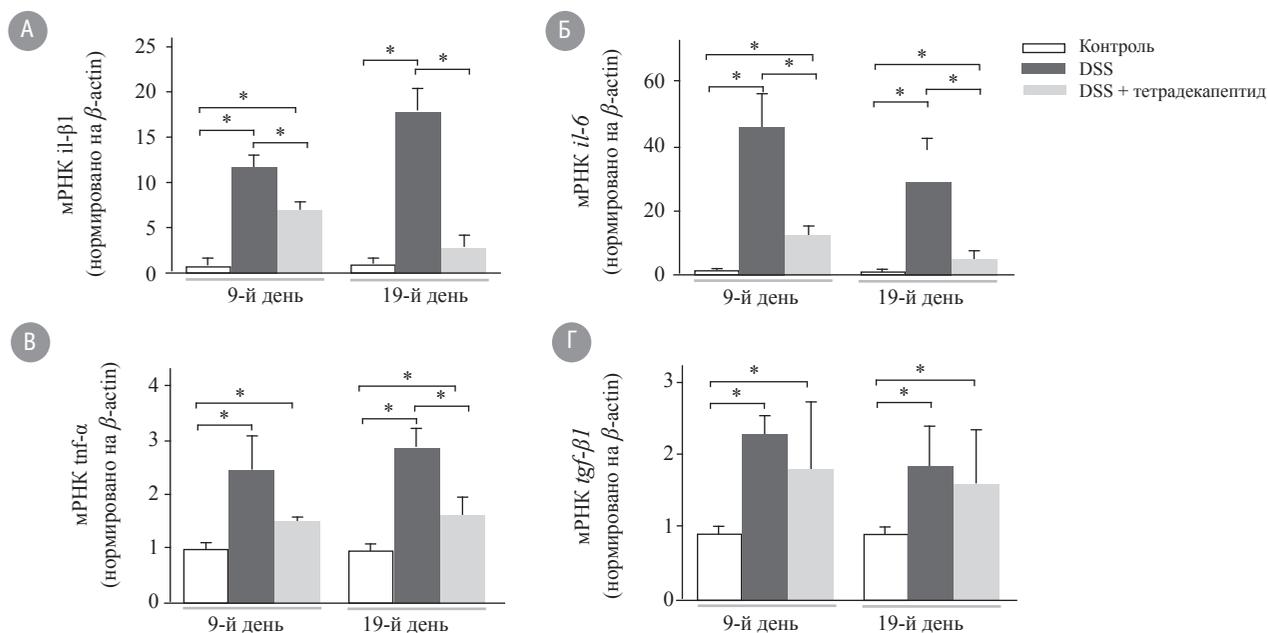


Рис. 3. Изменение относительной экспрессии мРНК генов *il1- β* (А), *il6* (Б), *tnf- α* (В), *tgf- β 1* (Г) в ткани кишки при развитии экспериментального колита на 9-й и 19-й дни и влияние терапии тетрадекапептидом на уровень исследованных генов. Приведено среднее по группе, * – $p < 0,05$.

В нашей работе было установлено, что терапия тетрадекапептидом в модели индуцированного язвенного колита существенно уменьшает клинические проявления болезни, снижает потерю веса животных, уменьшает укорочение длины кишки и интенсивность воспалительного процесса. Было установлено, что наиболее выраженный терапевтический эффект проявляется при втором цикле отравления сульфатом декстрана. Первый цикл затравки DSS моделирует острую фазу деструктивного воспалительного процесса в кишечнике, тогда как последующее повторное введение DSS моделирует хроническую стадию воспаления [67].

Индуцированное DSS-воспаление сопровождается инфильтрацией миелоидных и лимфоидных клеток в ткань кишки. Согласно нашим экспериментальным данным, представленным в данной работе, наибольшее увеличение наблюдается в инфильтрирующих популяциях гранулоцитов, моноцитов и макрофагов. Это согласуется с описанием патологических изменений в кишке, характерных для данной модели колита. Так, в ряде работ было показано, что инфильтрация нейтрофилов и эозинофилов в ткань кишки является важной фазой индукции воспаления и развития колита [68, 69]. Также было отмечено, что нейтрофилы играют важную роль в разрушении ткани кишки и образовании язв [68, 70]. Хорошо известны механизмы этого процесса и факторы, влияющие на инфильтрацию [71].

Развитие острого воспаления является активным процессом, для подавления которого необходимо ингибировать рекрутирование лейкоцитов в очаг воспаления и удалить лейкоциты из воспаленного участка путем

апоптоза и дальнейшего фагоцитоза макрофагами. Механизмы, лежащие в основе этих процессов, активно изучаются с позиций разработки терапевтических препаратов для контроля воспаления в ткани кишки [72]. Известно, что после первого цикла индуцированного колита, после стадии восстановления, вторая фаза активации колита также приводит к новой волне инфильтрации ткани кишки гранулоцитами и моноцитами [70]. В нашей работе исследованы изменения клеточного состава популяций лейкоцитов кишки в фазе восстановления, т. е. после отмены воздействия сульфатом декстрана и снижения развития показателей клинического проявления болезни. Судя по клинической картине развития заболевания, представленной в работе, восстановление в группе с терапией тетрадекапептидом происходит быстрее. Снижение продукции провоспалительных цитокинов в ткани кишки и отсутствие изменений в синтезе противовоспалительных цитокинов, а также снижение инфильтрации в ткань кишки популяций клеток, ассоциированных с воспалением: гранулоцитов, эозинофилов, макрофагов, моноцитов, – свидетельствуют о терапевтическом действии тетрадекапептида ТЕККRRETVEREKE в модели экспериментального колита. Улучшение клинических показателей в оба исследованных периода восстановления после действия сульфата декстрана позволяет предполагать, что заживление пораженных участков кишки при терапии тетрадекапептидом происходит быстрее. Причем после второго цикла декстрана при начале развития хронического воспаления терапия тетрадекапептидом проявляет наиболее выраженный эффект.

■ Литература/References

- Molodecky N.A., Soon I.S., Rabi D.M., Ghali W.A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012; 142 (1): 46–54.e42.
- de Mattos B.R.R., Pereira M., Garcia G., Nogueira J.B. et al. Inflammatory Bowel Disease : An Overview of immune mechanisms and biological treatments. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 493012.
- Kramer M.W., von Klot C.A., Kabbani M., Kabbani A.R. et al. Long-term bowel disorders following radial cystectomy: an underestimated issue? *World J Urol*. 2015; 33 (10): 1373–80.
- Малахова Н.С., Пичугин А.В., Халиф И.Л., Атауллаханов Р.И. Применение иммуномодулятора Гепон для лечения неспецифического язвенного колита. *Фарматека*. 2005; 6 (101): 105–8. [Malakhova N.S., Pichugin A.V., Caliph I.L., Ataulkhanov R.I. The use of immunomodulator Gepon for the treatment of ulcerative colitis. *Farmateka*. 2005; 6 (101): 105–8. (in Russian)]
- Лазебник Л.Б., Звенигородская Л.А., Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В. и др. Иммуномодулятор «Гефон» у больных пожилого возраста с эрозивно-язвенными поражениями гастроудоденальной зоны. *РМЖ*. 2004; 12 (23): 1349–52. [Lazebnik L.B., Zvenigorod L.A., Ataulkhanov R.I., Pichugin A.V. et al. Immunomodulator «Gepon» in elderly patients with erosive and ulcerative lesions of the gastroduodenal zone. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2004; 12 (23): 1349–52. (in Russian)]
- Melgar S., Karlsson L., Rehnström E., Karlsson A. et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol*. 2008; 8 (6): 836–44.
- Chassaing B., Aitken J.D., Malleshappa M., Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr. Protoc. Immunol*. 2014; 104: 15.25.1–14.
- Suzuki K., Sun X., Nagata M., Kawase T. et al. Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. *Pathol. Int*. 2011; 61 (4): 228–38.
- Kitajima S., Takuma S., Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp. Anim*. 1999; 48 (3): 137–43.
- Randhawa P.K., Singh K., Singh N., Jaggi A.S. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J. Physiol. Pharmacol*. 2014; 18 (4): 279–88.
- Whittem C.G., Williams A.D., Williams C.S. Murine colitis modeling using dextran sulfate sodium (DSS). *J. Vis. Exp*. 2010; 35: 6–8.
- Lean Q.Y., Eri R.D., Randall-Demllo S., Sohal S.S. et al. Orally administered enoxaparin ameliorates acute colitis by reducing macrophage-associated inflammatory responses. *PLoS One*. 2015; 10 (7): 1–24.
- Lukacs N.W., Strieter R.M., Chensue S.W., Widmer M. et al. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J. Immunol*. 1995; 154 (10): 5411–7.
- de Souza H.S.P., Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2015; 13 (1): 13–27.
- Saverymattu S.H., Peters A.M., Lavender J.P., Chadwick V.S. et al. In vivo assessment of granulocyte migration to diseased bowel in Crohn's disease. *Gut*. 1985; 26 (4): 378–83.
- Kucharzik T., Walsh S.V., Chen J., Parkos C.A. et al. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am. J. Pathol*. 2001; 159 (6): 2001–9.
- Brazil J.C., Louis N.A., Parkos C.A. The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis*. 2013; 19 (7): 1556–65.
- Ostanin D.V., Kurmaeva E., Furr K., Bao R. et al. Acquisition of antigen-presenting functions by neutrophils isolated from mice with chronic colitis. *J. Immunol*. 2012; 188 (3): 1491–502.
- Kurmaeva E., Bhattacharya D., Goodman W., Omenetti S. et al. Immunosuppressive monocytes: possible homeostatic mechanism to restrain chronic intestinal inflammation. *J. Leukoc. Biol*. 2014; 96 (3): 377–89.
- Mowat A.M., Agace W.W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol*. 2014; 14 (10): 667–85.
- Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013; 496 (7446): 445–55.
- Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Rep*. 2014; 6: 13.
- Smythies L.E., Sellers M., Clements R.H., Mosteller-Barnum M. et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J. Clin. Invest*. 2005; 115 (1): 66–75.
- Kamada N., Hisamatsu T., Okamoto S., Chinen H. et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest*. 2008; 118 (6): 2269–80.
- Smith A.M., Rahman F.Z., Hayee B., Graham S.J. et al. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med*. 2009; 206 (9): 1883–97.
- Bain C.C., Scott C.L., Uronen-Hansson H., Gudjonsson S. et al. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol*. 2013; 6 (3): 498–510.
- Rescigno M., Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J. Clin. Invest*. 2009; 119 (9): 2441–50.
- Rimoldi M., Chieppa M., Salucci V., Avogadri F. et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol*. 2005; 6 (5): 507–14.
- Hart A.L., Al-Hassi H.O., Rigby R.J., Bell S.J. et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005; 129 (1): 50–65.
- Mishra A., Hogan S.P., Lee J.J., Foster P.S. et al. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J. Clin. Invest*. 1999; 103 (12): 1719–27.
- Brandt E.B., Zimmermann N., Muntel E.E., Yamada Y. et al. The alpha4beta7-integrin is dynamically expressed on murine eosinophils and involved in eosinophil trafficking to the intestine. *Clin. Exp. Allergy*. 2006; 36 (4): 543–53.
- Lampinen M., Waddell A., Ahrens R., Carlson M. et al. CD14+CD33+ myeloid cell-CCL11-eosinophil signature in ulcerative colitis. *J. Leukoc. Biol*. 2013; 94 (5): 1061–70.
- Chu V.T., Beller A., Rausch S., Strandmark J. et al. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity*. 2014; 40 (4): 582–93.
- Murphy K.M., Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat. Immunol*. 2010; 11 (8): 674–80.
- O'Connor W., Zenewicz L.A., Flavell R.A. The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. *Nat. Immunol*. 2010; 11 (6): 471–6.
- Harrison O.J., Powrie F.M. Regulatory T cells and immune tolerance in the intestine. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2013; 5 (7): a018341.
- Mayne C.G., Williams C.B. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis*. 2013; 19 (8): 1772–88.

38. Mottet C., Uhlig H.H., Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2003; 170 (8): 3939–43.
39. Maul J., Loddenkemper C., Mundt P., Berg E. et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2005; 128 (7): 1868–78.
40. Huibregtse I.L., van Lent A.U., van Deventer S.J.H. Immunopathogenesis of IBD: insufficient suppressor function in the gut? *Gut.* 2007; 56 (4): 584–92.
41. Kelsen J., Agnholt J., Hoffmann H.J., Romer J.L. et al. FoxP3+CD4+CD25+ T cells with regulatory properties can be cultured from colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 141 (3): 549–57.
42. Ricciardelli I., Lindley K.J., Londei M., Quarantino S. Anti tumour necrosis- α therapy increases the number of FOXP3+ regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology.* 2008; 125 (2): 178–83.
43. Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M. et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood.* 2006; 108 (1): 253–61.
44. Veltkamp C., Anstaett M., Wahl K., Moller S. et al. Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNF treatment. *Gut.* 2011; 60 (10): 1345–53.
45. Neurath M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14 (5): 329–42.
46. van Dullemen H.M., van Deventer S.J.H., Hommes D.W., Bijl H.A. et al. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology.* 1995; 109 (1): 129–35.
47. Strober W., Fuss I.J., Blumberg R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20 (1): 495–549.
48. McDermott A.J., Higdon K.E., Muraglia R., Erb-Downward J.R. et al. The role of Gr-1(+) cells and tumor necrosis factor- α signalling during *Clostridium difficile* colitis in mice. *Immunology.* 2015; 144 (4): 704–16.
49. Di Sabatino A., Pender S.L.F., Jackson C.L., Prothero J.D. et al. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology.* 2007; 133 (1): 137–49.
50. Atreya R., Zimmer M., Bartsch B., Waldner M.J. et al. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14+ macrophages. *Gastroenterology.* 2011; 141 (6): 2026–38.
51. Li M.O., Flavell R.A. TGF- β : a master of all T cell trades. *Cell.* 2008; 134 (3): 392–404.
52. Valatas V., Filidou E., Drygiannakis I., Kolios G. Stromal and immune cells in gut fibrosis: the myofibroblast and the scarface. *Ann. Gastroenterol.* 2017; 30 (4): 393–404.
53. Monteleone G., Kumberova A., Croft N.M., Mckenzie C. et al. Blocking Smad7 restores TGF- β 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 2001; 108 (4): 523–6.
54. Aharoni R., Kayhan B., Brenner O., Domev H. et al. Immunomodulatory therapeutic effect of glatiramer acetate on several murine models of inflammatory bowel disease. *Pharmacology.* 2006; 318 (1): 68–78.
55. Kim J.J., Shajib M.S., Manocha M.M., Khan W.I. Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced model of IBD. *J. Vis. Exp.* 2012; 60: 1–7.
56. Cooper H.S., Murthy S.N., Shah R.S., Sedergran D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 1993; 69 (2): 238–49.
57. Hughes A. A simplified benzidine test with an evaluation of some faecal occult blood tests. *Br. Med. J.* 1952; 2 (4791): 970–5.
58. Zindl C.L., Lai J.-F., Lee Y.K., Maynard C.L. et al. IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110 (31): 12 768–73.
59. Krajina T., Leithäuser F., Möller P., Trobonjaca Z. et al. Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33 (4): 1073–83.
60. Koscsó B., Bogunovic M. Analysis and purification of mouse intestinal dendritic cell and macrophage subsets by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.* 2016; 8: 14.39.1–14.
61. Makita S., Kanai T., Nemoto Y., Totsuka T. et al. Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J. Immunol.* 2007; 178 (8): 4937–46.
62. Guo Z., Jang M.H., Otani K., Bai Z. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. *Int. Immunol.* 2008; 20 (3): 307–15.
63. Viennois E., Chen F., Laroui H., Baker M.T. et al. Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA. *BMC Res. Notes.* 2013; 6: 360.
64. Bustin S., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 2005; 34 (3): 597–601.
65. Stahlberg A., Kubista M. The workflow of single-cell expression profiling using quantitative real-time PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014; 14 (3): 323–31.
66. Lin Y., Yang X., Yue W., Xu X. et al. Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization. *Cell Mol. Immunol.* 2014; 11 (4): 355–66.
67. Breyneart C., Dresselaers T., Perrier C., Arijis I. et al. Unique gene expression and MR T2 relaxometry patterns define chronic murine dextran sodium sulphate colitis as a model for connective tissue changes in human Crohn's disease. *PLoS One.* 2013; 8 (7): e68876.
68. Bento A.F., Leite D.F.P., Claudino R.F., Hara D.B. et al. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. *J. Leukoc. Biol.* 2008; 84 (4): 1213–21.
69. Albert E.J., Duplisea J., Dawicki W., Haidl I.D. et al. Tissue eosinophilia in a mouse model of colitis is highly dependent on TLR2 and independent of mast cells. *Am. J. Pathol.* 2011; 178 (1): 150–60.
70. Bento A.F., Leite D.F.P., Marcon R., Claudino R.F. et al. Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice. *Biochem. Pharmacol.* 2012; 84 (11): 1459–69.
71. Fournier B.M., Parkos C.A. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2012; 5 (4): 354–66.
72. El Kebir D., Filep J.G. Targeting neutrophil apoptosis for enhancing the resolution of inflammation. *Cells.* 2013; 2 (2): 330–48.

© Коллектив авторов, 2019

Кузьмина У.Ш.¹, Зайнуллина Л.Ф.¹, Садовников С.В.¹, Вахитов В.А.¹,
Бахтиярова К.З.², Вахитова Ю.В.¹**NMDA-рецепторы регулируют гены ключевых иммунных функций в лимфоцитах больных рассеянным склерозом**¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр РАН», 450054, Уфа, Россия² ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450000, Уфа, Россия

Рассеянный склероз (РС) – аутоиммунное демиелинизирующее воспалительное заболевание центральной нервной системы. Помимо аутоиммунных механизмов, значительная роль в разрушении миелина, гибели нейронов и олигодендроцитов отводится нейромедиатору глутамату. Показано, что глутамат, продуцируемый активированными макрофагами и микроглией, посредством метабо- и ионотропных рецепторов запускает эксайтотоксические программы, что, как полагают, вносит вклад в формирование и поддержание нейродегенерации при РС. В последнее время стали появляться данные о том, что глутамат может выступать в роли иммуномодулятора, участвуя в контроле функций инфильтрованных в очаг воспаления Т-клеток. Кроме того, иммуномодуляция может осуществляться на уровне периферических Т-лимфоцитов при связывании глутамата с ионотропными рецепторами, в частности NMDA-подтипа. С целью установления роли NMDA-рецепторов в регуляции функций иммунокомпетентных клеток в данной работе проведен анализ экспрессионного профиля мононуклеаров, полученных из периферической крови пациентов с РС на фоне блокады NMDA-рецепторов с использованием коммерческого набора Human Signal Transduction Pathway Finder PCR Array. Показано, что действие антагониста NMDA-рецепторов (+)-MK801 в иммунных клетках, полученных от больных РС, приводит к изменению экспрессии генов, которые объединяются в 3 тесно взаимосвязанные и перекрывающиеся кластера: апоптоз, фосфорилирование, система цитокинов и хемокинов. Полученные данные позволяют предположить, что NMDA-рецепторы глутамата на уровне транскриптома могут участвовать в модуляции ключевых функций мононуклеаров, а также в регуляции процессов хемотаксиса иммунных клеток у больных РС.

Ключевые слова: рассеянный склероз; NMDA-рецепторы; анализ транскриптома; мононуклеары периферической крови

Статья поступила 19.04.2018. Принята в печать 16.05.2018.

Для цитирования: Кузьмина У.Ш., Зайнуллина Л.Ф., Садовников С.В., Вахитов В.А., Бахтиярова К.З., Вахитова Ю.В. NMDA-рецепторы регулируют гены ключевых иммунных функций в лимфоцитах больных рассеянным склерозом. Иммунология. 2019; 40 (1): 27–34. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11003.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр РАН» (№ АААА-А16-116020350033-8). Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель», Уфа, Россия).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Kuzmina U.Sh.¹, Zainullina L.F.¹, Sadovnikov S.V.¹, Vakhitov V.A.¹,
Bakhtiyarova K.Z.², Vakhitova Yu.V.¹**NMDA-receptors regulate the genes of key immune functions in lymphocytes of multiple sclerosis patients**¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Science, 450054, Ufa, Russia² Bashkir State Medical University, 450000, Ufa, Russia

Multiple sclerosis is an autoimmune demyelinating inflammatory disorder of the central nervous system. In addition to autoimmune mechanisms neurotransmitter glutamate plays a significant role in the destruction of myelin, oligodendrocyte and neuronal death. It was shown that glutamate produced by activated macrophages and microglia by ionotropic and metabotropic receptors mediates excitotoxic process which contributes to the formation and maintenance of neurodegeneration in MS. Recently the evidences were found that glutamate may act as an immunomodulator by control of functions of infiltrated T-cells in inflammation tissues. Furthermore, immunomodulation may be carried out by the glutamate ionotropic receptors, in particular the NMDA-subtype, at the level of peripheral T-lymphocytes. The aim of this

Для корреспонденции
Вахитова Юлия Венеровна –
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН,
заведующая лабораторией
молекулярной фармакологии
и иммунологии Института
биохимии и генетики –
обособленное структурное
подразделение ФГБНУ «Уфимский
федеральный исследовательский
центр РАН», Уфа, Россия
E-mail: juvv73@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-5022-0402>

study was the investigation of the role of NMDA-receptors in the regulation of immunocompetent cells functions by the comparative analysis of the genes expression profile in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients using a commercial kit Human Signal Transduction Pathway Finder PCR Array. It has been shown that in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients the antagonist NMDA-receptors (+)-MK801 caused the alteration of expression of genes which are composed to the closely related and overlapping clusters of biological processes such as apoptosis, phosphorylation, cytokine and chemokine signaling. These data suggest that the NMDA-receptors could be involved in the modulation of some of the key functions of mononuclear cells, as well as in the regulation of chemotaxis of immune cells in patients with multiple sclerosis.

Keywords: multiple sclerosis; NMDA-receptors; transcriptome analysis; peripheral blood mononuclear cells

Received 19.04.2018. **Accepted for publication** 16.05.2018.

For citation: Kuzmina U.Sh., Zainullina L.F., Sadovnikov S.V., Vakhitov V.A., Bakhtiyarova K.Z., Vakhitova Yu.V. NMDA-receptors regulate the genes of key immune functions in lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Immunologiya*. 2019; 40 (1): 27–34. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11003. (in Russian)

Acknowledgments. The work is done in the framework of the state assignment OFITS IBG RAS (No. AAAA-A16-116020350033-8). The studies were performed using equipment of the center "Bionica" (Department of biochemical research methods and nanobiotechnology RCCP Agidel, Ufa).

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

For correspondence

Vakhitova Yulia V. –
PhD, Corresponding Member
of the Russian Academy of Sciences,
Head of the Laboratory of Molecular
Pharmacology and Immunology,
Institute of Biochemistry
and Genetics – Subdivision
of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Science,
Ufa, Russia

E-mail: juvv73@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-5022-0402>

Введение

Рассеянный склероз (РС) – хроническое прогрессирующее аутоиммунное демиелинизирующее нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), поражающее преимущественно лиц молодого трудоспособного возраста и неизбежно ведущее к их инвалидизации. Существующие на сегодняшний день знания о РС позволяют рассматривать его патогенез как сложный многокомпонентный процесс, ведущую роль в котором играют аутоиммунные механизмы, обуславливающие развитие воспаления в ЦНС и последующую демиелинизацию нервных волокон, гибель нейронов и олигодендроцитов [1]. Согласно современным представлениям, нейродегенерация присутствует уже на ранних стадиях РС и может протекать параллельно с развитием воспаления и приводить к атрофии нервных волокон и нейронов, обуславливая нарастающую инвалидизацию больных [2]. Развитие нейродегенеративных процессов при РС (аксональной дегенерации и гибели нейронов) может быть обусловлено также продукцией иммунокомпетентными клетками крови и ЦНС таких токсичных молекул, как глутамат, активные формы кислорода и азота [3]. Глутамат, продуцирующийся в избытке различными клетками нервной и иммунной систем при РС, в настоящее время рассматривается в качестве одной из основных причин повреждения аксонов, нейронов и олигодендроцитов [4]. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют об участии глутамата в механизмах нейровоспаления, осуществляемом, в том числе за счет регуляции функций как поступивших в мозг аутореактивных Т-клеток, так и периферических Т-лимфоцитов [5].

Посредством ионотропных рецепторов, главным образом NMDA-подтипа, глутамат запускает эксайтотоксические программы, что, как полагают, вносит вклад в формирование и поддержание нейродегенерации при РС [6]. Отметим, однако, что функциональное значение рецепторов глутамата в патогенезе РС практически не исследовано. По данным ряда

авторов, антагонисты NMDA-рецепторов мемантин и (+)-MK801 снижают выраженность неврологических нарушений у животных с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЭАЭ), не препятствуя при этом развитию демиелинизации, однако уменьшают воспаление в ЦНС вследствие ограничения проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для цитокинов и Т-лимфоцитов [7, 8]. В то же время антагонисты AMPA-рецепторов более эффективно, чем антагонисты NMDA-рецепторов, устраняют неврологический дефицит, но не оказывают влияния на развитие воспаления в ЦНС [9]. Кроме того, на модели ЭАЭ показано существование протективного иммунного механизма, опосредованного периферическими Т-клетками, направленного, как полагают, на снижение токсического действия глутамата в ЦНС [5].

К настоящему времени доказана экспрессия ионотропных рецепторов глутамата на поверхности Т-клеток человека, а также установлена их роль в регуляции ключевых функций иммунокомпетентных клеток. Так, показано, что рецепторы глутамата участвуют в регуляции секреции цитокинов и механизмов дифференцировки субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов, контроле клеточного цикла, пролиферации и апоптоза, изменений мембранного потенциала клеток, модуляции активности ионных каналов, экспрессии генов, усилении образования свободных радикалов, интегрин-опосредованной адгезии к гликопротеинам экстраклеточного матрикса [10, 11]. Важно отметить, что в настоящий момент в доступной литературе имеются лишь единичные работы, посвященные изучению роли NMDA-рецепторов, экспрессированных на клетках иммунной системы, в функционировании Т-лимфоцитов больных с РС. С целью установления значения NMDA-рецепторов в регуляции функций иммунокомпетентных клеток в данной работе проведен сравнительный анализ экспрессионного профиля мононуклеаров периферической крови, полученных от пациентов с РС на фоне блокады NMDA-рецепторов.

Методы

Доноры. В исследование было включено 9 больных с достоверным диагнозом РС (ремиттирующий тип течения заболевания), согласно критериям, предложенным в [12]. Средний возраст доноров составил $38,5 \pm 11,5$ года. Выраженность неврологического дефицита у больных РС была определена врачом-неврологом на момент взятия крови на основе шкалы инвалидизации Куртцке в модификации Weiner и Elisson [13] Expanded Disability Status Scale (EDSS). Средний показатель по шкале EDSS составил $3,0 \pm 1,2$ балла (от 1 до 5 баллов), что говорит о преобладании числа пациентов с умеренной степенью инвалидизации. Ко времени забора крови у всех пациентов наблюдалась стадия ремиссии заболевания, подтвержденная неврологом, на основании клинического осмотра и заключений о результатах магнитно-резонансной томографии головного мозга. Все больные РС, участвующие в исследовании, получали иммуномодулирующую терапию препаратами интерферона β -1a. У всех доноров было получено письменное информированное согласие. Работа получила одобрение в Локальном этическом комитете при Институте биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр РАН», Уфа, Россия.

Фракцию мононуклеаров выделяли из периферической венозной крови доноров – больных РС. Выделение клеток проводили по стандартной методике центрифугирования в градиенте плотности фиколла ($1,077 \text{ г/см}^3$) [14].

Клетки стимулировали через Т-клеточный рецептор моноклональными антителами (МКА) против CD3 (aCD3 МКА, 2,5 мкг/мл; клон ОСТ3, eBioscience, США) и CD28 (aCD28 МКА, 1,25 мкг/мл; клон CD28.2; BD Pharmingen, США) и культивировали в течение 4 ч (контрольная группа). Мононуклеары опытной группы инкубировали с неконкурентным антагонистом NMDA-рецепторов (+)-МК801 (100 мкМ; Tocris, США) 5 мин, далее клетки отмывали фосфатно-солевым буфером и стимулировали комплексом aCD3/CD28 также в течение 4 ч, после чего выделяли образцы тотальной РНК.

Анализ экспрессионного профиля генов, уровень мРНК которых регулируется NMDA-рецепторами, проводили с помощью коммерческого набора Human Signal Transduction Pathway Finder PCR Array (SABiosciences, США). Образцы тотальной РНК выделяли из $2 \cdot 10^6$ клеток с использованием экстрагирующего раствора TRI Reagent (MRC, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Последующие выделение и очистку проводили с помощью коммерческого набора Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, США). Количество и качество выделенных образцов РНК контролировали с помощью спектрофотометра NanoDrop 3000 (Thermo Scientific, США), а также электрофорезом в 1% агарозном геле. кДНК получали из 2 мкг суммарной РНК реакцией обратной транскрипции с использованием 0,5 мкг oligo(dT)12–18-праймеров и 40 единиц активности обратной транскриптазы RevertAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, США). Для проведения ПЦР в режиме реального вре-

мени использовали набор RT² SYBR Green/Fluor qPCR Mastermix (SABiosciences, США) в соответствии с протоколом производителя на приборе iQTM5 Multicolor RealTime PCR Detection System (BioRad, США). Результаты ОТ-ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.4 (SABiosciences, США), доступного на сайте производителя (www.pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php). После нормализации по положительным контролям [5 генов «домашнего хозяйства»: *B2M* (Beta-2-microglobulin), *HPRT1* (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase), *RPL13A* (Ribosomal protein L13a), *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *ACTB* (Actin-beta)], были отобраны гены со статистически значимыми изменениями уровня мРНК. Гены, уровень транскриптов которых изменялся не менее чем в 1,5 раза, далее верифицировали методом количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени (6 доноров – больных РС) с использованием 2,5× реакционной смеси ПЦР-Микс («Синтол», Россия), содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green I. Результаты ОТ-ПЦР нормализовали по уровню экспрессии гена «домашнего хозяйства» *HPRT1*. Изменения в уровнях мРНК генов рассчитывали с использованием значений пороговых циклов в специализированной программе REST Tool V. 2.0.7 (Corbett Research, США).

Функциональный анализ in silico. Функциональный кластерный анализ групп дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) проводили с помощью биоинформационной онлайн-программы DAVID [Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; www.david.abcc.ncifcrf.gov]. Программа DAVID объединяет ряд биологических баз данных (BIOCARTA, KEGG, PANTHER, REACTOME), в которых аккумулирована геномная, протеомная, химическая, функциональная информация; она прежде всего предназначена для интерпретации данных геномного секвенирования и транскрипционного профилирования [15]. Для функционального анализа мы использовали следующие значения параметров кластеризации: высокая классификационная жесткость (High Classification Stringency), уровень обогащения EASE $\leq 0,01$. Алгоритм EASE (Expression Analysis Systematic Explorer) использует для определения значения *p*-модифицированный точный тест Фишера, который применяется для проверки нулевой гипотезы о том, что список генов содержит лишь случайное количество элементов, ассоциированных с конкретной функциональной категорией. Затем полученные уровни значимости *p* были скорректированы программой DAVID с поправкой на множественные сравнения Бенжамини–Хохберга [16] и использованы для дальнейшей работы.

Результаты

Изменения транскриптома антиген-стимулированных клеток больных РС, индуцированные воздействием антагониста NMDA-рецепторов (+)-МК801, анализировали с использованием коммерческого набора Human Signal Transduction Pathway Finder PCR Array,

Функциональная кластеризация дифференциально экспрессирующихся генов в мононуклеарах больных рассеянным склерозом при блокаде NMDA-рецепторов

Биологический процесс (коэффициент обогащения); ген/относительный уровень мРНК	Термин генных онтологий (GO)
Апоптоз (5,68) <i>BCL2A1</i> /0,21 ± 0,01 ($p = 0,00$) <i>FAS</i> /0,45 ± 0,11 ($p = 0,04$) <i>NAIP</i> /0,39 ± 0,04 ($p = 0,01$) <i>BIRC3</i> /0,15 ± 0,02 ($p = 0,03$) <i>CSF2</i> /0,17 ± 0,02 ($p = 0,02$) <i>IL2</i> /0,34 ± 0,02 ($p = 0,01$) <i>MYC</i> /0,36 ± 0,03 ($p = 0,01$) <i>CDKN1B</i> /0,28 ± 0,03 ($p = 0,02$) <i>GADD45A</i> /0,20 ± 0,05 ($p = 0,00$) <i>HSP90AA2</i> /0,26 ± 0,03 ($p = 0,00$)	Антиапоптоз (GO:0006916), $p^* = 1,14 \cdot 10^{-4}$ Регуляция активации апоптоза (GO:0042981), $p^* = 1,20 \cdot 10^{-3}$ Регуляция программированной клеточной смерти (GO:0043067), $p^* = 2,60 \cdot 10^{-3}$ Регуляция клеточной смерти (GO:0010941), $p^* = 6,59 \cdot 10^{-4}$
Фосфорилирование (2,76) <i>CSF2</i> /0,17 ± 0,02 ($p = 0,02$) <i>CDKN1B</i> /0,28 ± 0,03 ($p = 0,02$) <i>IL2</i> /0,34 ± 0,02 ($p = 0,01$) <i>IGFBP3</i> /0,29 ± 0,02 ($p = 0,00$) <i>GADD45A</i> /0,20 ± 0,05 ($p = 0,00$)	Негативная регуляция фосфорилирования (GO:0042326), $p^* = 0,06$ Негативная регуляция метаболизма фосфора (GO:0010563), $p^* = 0,06$ Негативная регуляция метаболизма фосфата (GO:0045936), $p^* = 0,06$
Система цитокинов и хемокинов (2,69) <i>FAS</i> /0,45 ± 0,11 ($p = 0,04$) <i>CCL20</i> /0,30 ± 0,02 ($p = 0,04$) <i>CSF2</i> /0,17 ± 0,02 ($p = 0,02$) <i>IGFBP3</i> /0,29 ± 0,02 ($p = 0,00$) <i>IL2</i> /0,34 ± 0,02 ($p = 0,01$) <i>IL18</i> /0,27 ± 0,06 ($p = 0,01$)	Цитокин- и хемокин-опосредованный сигнальный путь (GO:0019221), $p^* = 0,02$ Цитокиновая активность (GO:0005125), $p^* = 0,15$; Экстраклеточное пространство (GO:0005615), $p^* = 0,15$ Взаимодействие «цитокин – цитокиновый рецептор» (hsa04060), $p^* = 0,08$ Активация лейкоцитов (GO:0045321), $p^* = 0,09$ Клеточная активация (GO:0001775), $p^* = 0,14$
Дифференциально экспрессирующиеся гены, не вошедшие в кластеры <i>FASN</i> /0,15 ± 0,02 ($p = 0,00$) <i>PTCH1</i> /0,31 ± 0,03 ($p = 0,03$) <i>ODC1</i> /0,32 ± 0,06 ($p = 0,00$) <i>FOS</i> /0,34 ± 0,03 ($p = 0,04$) <i>EN1</i> /0,34 ± 0,04 ($p = 0,02$) <i>HOXA1</i> /0,40 ± 0,06 ($p = 0,03$) <i>WISP1</i> /5,06 ± 0,95 ($p = 0,04$)	

Примечание. Данные по экспрессии генов представлены в виде $M \pm SEM$; p – достоверность различий уровня мРНК по сравнению с контрольной группой. GO – идентификатор функциональной категории (биологического процесса) по классификации базы данных Gene Ontology; hsa – код метаболического пути по классификации базы данных KEGG Pathway; p^* – уровень значимости с поправкой на множественные сравнения Бенджамини–Хохберга, характеризующий правильность отнесения данного набора генов к определенному биологическому процессу [16]; коэффициент обогащения – среднее геометрическое значений p^* членов в соответствующем аннотационном кластере, обозначающее уровень биологической значимости данного функционального кластера.

содержащего иммобилизованные олигонуклеотиды для 84 генов. Сравнение экспрессионного профиля генов в экспериментальных группах «TCR-активированные лимфоциты доноров – больных РС + (+)-МК801» и «TCR-активированные лимфоциты доноров – больных РС» показало снижение уровня мРНК большинства генов (19 из 20), а увеличение экспрессии выявлено лишь для одного транскрипта (см. таблицу).

С использованием онлайн-ресурса DAVID проведена функциональная кластеризация групп дифференциально экспрессирующихся генов во фракции мононуклеаров при блокаде NMDA-рецепторов. Анализ групп генов, дифференциально экспрессирующихся в активи-

рованных иммунных клетках доноров – больных РС при действии антагониста NMDA-рецепторов, указывает на ассоциацию транскриптов с такими категориями клеточных процессов, как апоптоз, фосфорилирование, система цитокинов и хемокинов (см. таблицу). В этой экспериментальной группе отдельные гены (*FASN*, *PTCH1*, *ODC1*, *FOS*, *EN1*, *HOXA1*, *WISP1*) не распределены по категориям молекулярных функций. Подчеркнем, что продукты многих генов, изменивших экспрессию, могут участвовать в нескольких процессах, и для некоторых генов их функция в иммунокомпетентных клетках неизвестна.

Обсуждение

Результаты данной работы свидетельствуют о принадлежности генов, ответивших на действие антагониста NMDA-рецепторов в мононуклеарах больных РС, к таким биологическим процессам, как апоптоз (*BCL2A1, FAS, NAIP, BIRC3, CSF2, ИЛ2, MYC, CDKN1B, GADD45A, HSP90AA2*), фосфорилирование (*CSF2, CDKN1B, ИЛ2, IGFBP3, GADD45A*), система цитокинов и хемокинов (*FAS, CCL20, CSF2, IGFBP3, ИЛ2, ИЛ8*) (см. таблицу). Ранее нами было показано, что действие антагониста NMDA-рецепторов в Т-клетках, полученных от здоровых доноров, приводит к изменению экспрессии генов, которые объединяются в 4 тесно взаимосвязанных и перекрывающихся кластера: клеточная активация, апоптоз, клеточная пролиферация и дифференциация клеток [17], что свидетельствует о схожести паттернов биологических процессов, регулируемых данным подтипом рецепторов глутамата в Т-лимфоцитах здоровых лиц и больных РС.

В своей работе А.К. Kemppinen и соавт. [18] систематизировали результаты полногеномных исследований экспрессии генов в периферических иммунных клетках больных РС, полученные несколькими исследовательскими группами. Оказалось, что большинство дифференциально экспрессирующихся генов входят в функциональные кластеры, ассоциированные с цитокиновым сигналингом (ИЛ-6, ИЛ-17, ИЛ-10, ИЛ-4, TNF1, ИЛ-2, ИЛ-15), глюкокортикоидными рецепторами, NF-κB-, p38-, PPARα/RXRα-, SAPK/JNK-, PI3K/AKT – регулируемые сигнальными каскадами, механизмами онкогенеза и др. Аналогичное исследование, в котором проведен анализ агрегированных данных об экспрессионных профилях периферических иммунных клеток больных РС, показало участие большинства дифференциально экспрессирующихся генов в процессах воспаления, регуляции иммунных функций, апоптоза, адгезии лимфоцитов, сплайсинга РНК [19–21]. Отмечено также изменение экспрессии ряда генов, белковые продукты которых вовлечены в механизмы цитокинового и хемокинового сигналинга [22, 23]. R. Vomprezzi и соавт. [24] наряду с генами, задействованными в контроле иммунных функций и межклеточных взаимодействий, отмечают также изменения уровней транскриптов, участвующих в контроле клеточного цикла. Согласно данным, полученным в результате анализа транскриптома лимфоцитов больных РС, > 80% выявленных генов относились к связанным с апоптотическими сигнальными путями, причем как про-, так и противоапоптотическими, что отражает дисбаланс между устойчивостью и чувствительностью лимфоцитов к апоптозу при РС [25].

Анализ имеющихся в литературе сведений о генах и сигнальных путях, ответивших на блокаду антагонистом (+)-МК801, позволил предположить их вовлеченность в патогенез РС. Остановимся подробнее на некоторых из них.

Общеизвестно, что дисрегуляция запрограммированной клеточной смерти, в частности за счет ослабления апоптоза активированных аутореактивных Т-клеток и, как следствие, недостаточной их элиминации, является важным звеном патогенеза аутоиммунных заболеваний [26]. У больных РС наблюдается снижение спонтанной гибели клеток, резистентность периферических Т-лимфоцитов к *Fas*-опосредованному апоптозу, сочетающаяся с повышенной экспрессией антиапоптотических белков, преимущественно принадлежащих к семейству Bcl-2, и подавлением экспрессии проапоптотических белков (Bax и некоторых каспаз). Гены *BIRC3* и *NAIP* кодируют белки – ингибиторы апоптоза *BIRC3* (cIAP-2, HIAP-1) и *NAIP* (белок – ингибитор нейронального апоптоза) соответственно. Белок *BIRC3* экспрессируется в лимфоцитах, его антиапоптотическая активность обусловлена непосредственным ингибированием каспаз 3, 7 и прокаспазы 9. Повышенная экспрессия *BIRC3* в митоген-стимулированных Т-клетках больных с ремитирующим типом течения РС коррелирует с манифестацией заболевания и резистентностью Т-клеток к апоптозу [27]. В работе А.Л. Hebb и соавт. [28] установлено увеличение уровня мРНК гена *NAIP* в Т-клетках больных ремитирующим и первично-прогрессирующим типом течения заболевания, причем в случае оценки содержания мРНК этого гена в лимфоцитах больных, получающих патогенетическую терапию, авторы отмечали снижение данного параметра.

Выявленное нами снижение экспрессии некоторых антиапоптотических генов (*BIRC3, NAIP, BCL2A1*) в периферических иммунных клетках доноров – больных РС может быть одним из механизмов, способствующих увеличению чувствительности клеток к апоптозу при действии антагониста NMDA-рецепторов.

Ген *CCL20* кодирует хемокин, являющийся лигандом хемокинового рецептора CCR6. Взаимодействие *CCL20* со своим рецептором регулирует хемоаттракцию к эндотелию CCR6-экспрессирующих клеток, включая незрелые дендритные клетки, эффекторные Т-клетки, в том числе Th17, Т-клетки памяти и В-клетки [29]. Показано, что использование антител против *CCL20* при ЭАЭ значительно снижало выраженность клинических проявлений и нейровоспаления [30]. Обнаружение повышенного уровня *CCL20* в сыворотке пациентов с РС подчеркивает важную роль данного хемокина в патогенезе заболевания [31].

ИЛ-8 (CXCL8) – один из основных медиаторов воспалительного ответа, являющийся представителем семейства хемокинов CXС. ИЛ-8 индуцирует хемоаттракцию, миграцию и инфильтрацию нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток к очагам воспаления, способствуя адгезии клеток крови к эндотелию сосудов [32]. В работе В.Т. Lund и соавт. [33] установлено повышенное содержание CXCL8 в сыворотке больных РС, а также увеличение секреции ИЛ-8 CD14-позитивными клетками периферической крови пациентов по сравнению со здоровыми донорами. Авторы полагают, что ИЛ-8 может опосредовать мобилизацию и последующую инфильтрацию моно-

цитов через ГЭБ и тем самым способствовать развитию воспаления в ЦНС. На моделях экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита животных показано, что блокада CXCR2 приводит к снижению инфильтрации полиморфно-ядерных лейкоцитов в ЦНС и меньшей выраженности патологических проявлений [34].

Полученные нами данные о подавлении экспрессии генов, кодирующих хемокины CCL20 и CXCL8 при действии (+)-MK801, могут свидетельствовать в пользу предположения о возможном протективном эффекте антагонистов NMDA-рецепторов в отношении одного из звеньев патогенеза РС.

Заключение

В данной работе мы провели исследование профиля мРНК генов, дифференциально экспрессирующихся в мононуклеарах больных РС при блокаде NMDA-рецепторов глутамата. Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении ДЭГ, идентифицированных в иммунных клетках больных РС, в механизмы межклеточного взаимодействия, фосфорилирования и апоптоза. Это позволяет предположить, что NMDA-рецепторы глутамата на уровне транскриптома могут участвовать в мо-

дуляции некоторых ключевых функций мононуклеаров, а также в регуляции процессов хемотаксиса иммунных клеток у больных РС. Ряд авторов подчеркивает необходимость изучения изменений в работе тех или иных генов в мононуклеарах периферической крови больных РС, поскольку они отражают интенсивность течения патологии и могут служить в качестве прогностических маркеров и, возможно, терапевтических мишеней [22].

Участие авторов. Кузьмина У.Ш. – сбор и обработка материала, проведение экспериментов, анализ полученных данных, написание текста; Зайнуллина Л.Ф. – проведение экспериментов, анализ полученных данных; Садовников С.В. – проведение экспериментов, анализ полученных данных; Вахитов В.А. – разработка концепции и дизайна исследования, написание текста, редактирование; Бахтиярова К.З. – медицинский осмотр и подбор пациентов для исследования, редактирование; Вахитова Ю.В. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста, редактирование. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и утверждении окончательного варианта рукописи.

Литература

1. Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н. Рассеянный склероз : руководство для врачей. М. : МЕДпресс-информ, 2016.
2. Бойко А.Н., Петров С.В., Нестерова В.А., Гусев Е.И. Механизмы развития нейродегенеративного процесса при рассеянном склерозе – нейропротективное влияние препаратов бета-интерферона сегодня и нейротрофические факторы завтра. Журн. неврол. и психиатр. 2003; Спецвып. 2: 83–90.
3. Friese M.A., Schattling B., Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 2014; 10: 225–38. doi: 10.1038/nrneurol.2014.37.
4. Levite M. Glutamate, T cells and multiple sclerosis. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 2017; 124: 775–98. doi: 10.1007/s00702-014-1167-5.
5. Schori H., Yoles E., Schwartz M. T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 2001; 119: 199–204.
6. Pitt D., Werner P., Raine C.S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 2000; 6: 67–70. doi: 10.1038/71555.
7. Paul C., Bolton C. Modulation of blood-brain barrier dysfunction and neurological deficits during acute experimental allergic encephalomyelitis by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 302: 50–7.
8. Абдурасулова И.Н., Сердюк С.Е., Гмиро В.Е. Комбинированная блокада NMDA и GLUR1 AMPA рецепторов уменьшает тяжесть неврологических нарушений и длительность течения экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у крыс. *Нейроиммунология.* 2007; 1; 4–11.
9. Smith T., Groom A., Zhu B., Turski L. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat. Med.* 2000; 6: 62–6. doi: 10.1371/journal.pone.0034933.
10. Зайнуллина Л.Ф., Ямиданов Р.С., Вахитов В.А., Вахитова Ю.В. NMDA-рецепторы - возможные компоненты депозависимого входа Ca²⁺ в Т-лимфоциты человека. *Биохимия.* 2011; 76 (11): 1517–24.
11. Ganor Y., Levite M. The neurotransmitter glutamate and human T cells: glutamate receptors and glutamate-induced direct and potent effects on normal human T cells, cancerous human leukemia and lymphoma T cells, and autoimmune human T cells. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 2014; 121 (8): 983–1006. doi: 10.1007/s00702-014-1167-5.
12. Thompson A.J., Banwell B.L., Barkhof F., Carroll W.M. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018; 17 (2): 162–73. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
13. Weiner H.L., Ellison H.L. A working protocol to be used as a guideline for trials in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 1983; 40: 704–10.
14. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968; 97: 77–89.
15. Huang W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2009; 4: 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
16. Benjamini Y., Hochberg Y.J. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 1995; 57: 289–300.
17. Кузьмина У.Ш., Зайнуллина Л.Ф., Садовников С.В., Вахитов В.А. и др. NMDA-рецепторы регулируют гены ключевых иммунных функций в мононуклеарах периферической крови человека. *Бюл. exper. биол.* 2018; 165 (2): 216–20.
18. Kempainen A.K., Kaprio J., Palotie A., Saarela J. Systematic review of genome-wide expression studies in multiple sclerosis. *BMJ Open.* 2011; 1 (1). Article ID e000053.
19. Lindberg R.L., Kappos L. Transcriptional profiling of multiple sclerosis: towards improved diagnosis and treatment. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6: 843–55. doi: 10.1586/14737159.6.6.843.
20. Liu M., Hou X., Zhang P. Hao Y. et al. Microarray gene expression profiling analysis combined with bioinformatics in multiple sclerosis. *Mol. Biol. Rep.* 2013; 40: 3731–7. doi: 10.1007/s11033-012-2449-3.
21. Paraboschi E.M., Cardamone G., Rimoldi V., Gemmati D. et al. Meta-analysis of multiple sclerosis microarray data reveals dysregulation in RNA splicing regulatory genes. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 23 463–81. doi: 10.3390/ijms161023463.

22. Achiron A., Gurevich M., Friedman N., Kaminski N. et al. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Ann. Neurol.* 2004; 55: 410–7. doi: 10.1002/ana.20008.

23. Iglesias A.H., Camelo S., Hwang D., Villanueva R. et al. Microarray detection of E2F pathway activation and other targets in multiple sclerosis peripheral blood mononuclear cells. *J. Neuroimmunol.* 2004; 150: 163–77. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.01.017.

24. Bompreszi R., Ringnér M., Kim S., Bittner M.L. et al. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12: 2191–9. doi: 10.1093/hmg/ddg221.

25. Satoh J., Nakanishi M., Koike F., Miyake S. et al. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis // *Neurobiol. Dis.* 2005; 18 (3): 537–50. doi: 10.1016/j.nbd.2004.10.007.

26. Macchi B., Marino-Merlo F., Nocentini U., Pisani V. et al. Role of inflammation and apoptosis in multiple sclerosis: comparative analysis between the periphery and the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 2015; 287: 80–7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.08.016.

27. Sharief M.K., Semra Y.K. Upregulation of the inhibitor of apoptosis proteins in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2001; 119: 350–7. doi: 10.1016/S0165-5728(01)00365-4.

28. Hebb A.L., Moore C.S., Bhan V., Campbell T. et al. Expression of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during

autoimmune mediated demyelination. *Mult. Scler.* 2008; 14: 577–94. doi: 10.1177/1352458507087468.

29. Schutyser E., Struyf S., Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14: 409–26.

30. Mony J.T., Khorooshi R., Owens T. Chemokine receptor expression by inflammatory T cells in EAE. *Front. Cell Neurosci.* 2014; 8: 187. doi: 10.3389/fncel.2014.00187.

31. Jafarzadeh A., Bagherzadeh S., Ebrahimi H.A., Hajghani H. et al. Higher circulating levels of chemokine CCL20 in patients with multiple sclerosis: evaluation of the influences of chemokine gene polymorphism, gender, treatment and disease pattern. *J. Mol. Neurosci.* 2014; 53: 500–5. doi: 10.1007/s12031-013-0214-2.

32. Russo R.C., Garcia C.C., Teixeira M.M., Amaral F.A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases // *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2014. Vol. 10, N 5. P. 593–619. doi: 10.1586/1744666X.2014.894886.

33. Lund B.T., Ashikian N., Ta H.Q., Chakryan Y. et al. Increased CXCL8 (IL-8) expression in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2004; 155 (1–2). 161–71. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.06.008.

34. Carlson T., Kroenke M., Rao P., Lane T.E. et al. The Th17-ELR1CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 2008; 205: 811–23. doi: 10.1084/jem.20072404.

■ References

- Shmidt T.E., Jahno N.N. Multiple sclerosis: a guide for doctors. 5th ed. Moscow: MEDpress-inform, 2016. (in Russian)
- Boyko A.N., Petrov S.V., Nesterova V.A., Gusev E.I. Mechanisms of development of neurodegenerative processes in multiple sclerosis: neuroprotective influence of beta-interferons today and neurotrophic factors – tomorrow. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova.* 2003; (Spec No. 2): 83–90. (in Russian)
- Friese M.A., Schattling B., Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 2014; 10: 225–38. doi: 10.1038/nrneurol.2014.37.
- Levite M. Glutamate. T cells and multiple sclerosis. *J. Neural Transm. (Vienna).* 2017; 124: 775–98. doi: 10.1007/s00702-014-1167-5.
- Schori H., Yoles E., Schwartz M. T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 2001; 119: 199–204.
- Pitt D., Werner P., Raine C.S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 2000; 6: 67–70. doi: 10.1038/71555.
- Paul C., Bolton C. Modulation of blood-brain barrier dysfunction and neurological deficits during acute experimental allergic encephalomyelitis by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 302: 50–7.
- Abdurasulova I.N., Serdyuk S.E., Gmiro V.E. The combined blockade of NMDA and GluR1 AMPA receptors decreases severity of neurologic disturbances and duration of the experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Neyroimmunologiya.* 2007; (1): 4–11. (in Russian)
- Smith T., Groom A., Zhu B., Turski L. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat. Med.* 2000; 6: 62–6. doi: 10.1371/journal.pone.0034933.
- Zainullina L.F., Jamidanov R.S., Vakhitov V.A., Vakhitova Yu.V. NMDA- receptors are possible components of the depot-dependent input of Ca²⁺ into human T-lymphocytes. *Biokhimiya.* 2011; 76 (11): 1517–24. (in Russian)
- Ganor Y., Levite M. The neurotransmitter glutamate and human T cells: glutamate receptors and glutamate-induced direct and potent effects on normal human T cells, cancerous human leukemia and lymphoma T cells, and autoimmune human T cells. *J. Neural Transm. (Vienna).* 2014; 121 (8): 983–1006. doi: 10.1007/s00702-014-1167-5.
- Thompson A.J., Banwell B.L., Barkhof F., Carroll W.M. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018; 17 (2): 162–73. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
- Weiner H.L., Ellison H.L. A working protocol to be used as a guideline for trials in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 1983; 40: 704–10.
- Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968; 97: 77–89.
- Huang W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2009; 4: 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- Benjamini Y., Hochberg Y.J. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 1995; 57: 289–300.
- Kuzmina U.Sh., Zainullina L.F., Sadovnikov S.V., Vakhitov V.A. et al. NMDA- receptors regulates the genes of the key immune functions in human peripheral blood mononuclear cells. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny.* 2018; 165 (2): 216–20. (in Russian)
- Kemppinen A.K., Kaprio J., Palotie A., Saarela J. Systematic review of genome-wide expression studies in multiple sclerosis. *BMJ Open.* 2011; 1 (1): e000053.
- Lindberg R.L., Kappos L. Transcriptional profiling of multiple sclerosis: towards improved diagnosis and treatment. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6: 843–55. doi: 10.1586/14737159.6.6.843.
- Liu M., Hou X., Zhang P. Hao Y. et al. Microarray gene expression profiling analysis combined with bioinformatics in multiple sclerosis. *Mol. Biol. Rep.* 2013; 40: 3731–7. doi: 10.1007/s11033-012-2449-3.
- Paraboschi E.M., Cardamone G., Rimoldi V., Gemmati D. et al. Meta-analysis of multiple sclerosis microarray data reveals dysregulation in RNA splicing regulatory genes. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 23 463–81. doi: 10.3390/ijms161023463.

22. Achiron A., Gurevich M., Friedman N., Kaminski N. et al. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Ann. Neurol.* 2004; 55: 410–7. doi: 10.1002/ana.20008.
23. Iglesias A.H., Camelo S., Hwang D., Villanueva R. et al. Microarray detection of E2F pathway activation and other targets in multiple sclerosis peripheral blood mononuclear cells. *J. Neuroimmunol.* 2004; 150: 163–77. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.01.017.
24. Bompreszi R., Ringnér M., Kim S., Bittner M.L. et al. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12: 2191–9. doi: 10.1093/hmg/ddg221.
25. Satoh J., Nakanishi M., Koike F., Miyake S. et al. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2005; 18 (3): 537–50. doi: 10.1016/j.nbd.2004.10.007.
26. Macchi B., Marino-Merlo F., Nocentini U., Pisani V. et al. Role of inflammation and apoptosis in multiple sclerosis: comparative analysis between the periphery and the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 2015; 287: 80–7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.08.016.
27. Sharief M.K., Semra Y.K. Upregulation of the inhibitor of apoptosis proteins in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2001; 119: 350–7. doi: 10.1016/S0165-5728(01)00365-4.
28. Hebb A.L., Moore C.S., Bhan V., Campbell T. et al. Expression of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination. *Mult. Scler.* 2008; 14: 577–94. doi: 10.1177/1352458507087468.
29. Schutyser E., Struyf S., Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14: 409–26.
30. Mony J.T., Khorrooshi R., Owens T. Chemokine receptor expression by inflammatory T cells in EAE. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8: 187. doi: 10.3389/fncel.2014.00187.
31. Jafarzadeh A., Bagherzadeh S., Ebrahimi H.A., Hajghani H. et al. Higher circulating levels of chemokine CCL20 in patients with multiple sclerosis: evaluation of the influences of chemokine gene polymorphism, gender, treatment and disease pattern. *J. Mol. Neurosci.* 2014; 53: 500–5. doi: 10.1007/s12031-013-0214-2.
32. Russo R.C., Garcia C.C., Teixeira M.M., Amaral F.A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2014; 10 (5): 593–619. doi: 10.1586/1744666X.2014.894886.
33. Lund B.T., Ashikian N., Ta H.Q., Chakryan Y. et al. Increased CXCL8 (IL-8) expression in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2004; 155 (1–2): 161–71. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.06.008.
34. Carlson T., Kroenke M., Rao P., Lane T.E. et al. The Th17-ELR1CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 2008; 205: 811–23. doi: 10.1084/jem.20072404.

© Коллектив авторов, 2019

Щубелко Р.В.¹, Зуйкова И.Н.², Шульженко А.Е.², Андреев И.В.³, Авоян Г.Э.³, Сулова О.С.³

Рецидивирующие воспалительные заболевания ротоглотки – роль факторов мукозального иммунитета

¹ Многопрофильный медицинский центр «Клиника К+31», 119415, Москва, Россия

² Отделение аллергологии № 6 ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115478, Москва, Россия

³ Лаборатория моделирования иммунологических процессов № 91 ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115478, Москва, Россия

Частые рецидивы воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей (ВДП) – состояние, которое выходит за рамки сугубо оториноларингологической практики. Очевидно, что в таких случаях речь идет о нарушении защитных механизмов на системном и/или местном уровне. Эти пациенты все чаще попадают в поле зрения иммунологов, поэтому на современном этапе необходимо понимать как этиопатогенез данного состояния, так и варианты иммунологической дисфункции, формирующейся у этой группы пациентов.

Цели исследования – определение спектра микробиологического состава ротоглотки и исследование факторов местного иммунитета у пациентов с частыми рецидивами воспалительных заболеваний ВДП.

Материал и методы. Определялась бактериальная микрофлора ротоглотки путем посевов из зева, миндалин, наличие и концентрация вирусов герпес-группы в смешанной слюне (методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени), также определялась концентрация защитных факторов слюны (α -дефензины, кателицидин LL-37, лактоферрин, секреторный IgA) у пациентов с частыми рецидивами воспалительных заболеваний ВДП вне периода обострения.

Результаты. У часто болеющих взрослых микробный пейзаж вне периода обострения представлен сочетанной бактериальной (реже патогенной, в большей степени условно-патогенной) и вирусной (преимущественно ВЭБ, ВГЧ 6-го типа) микрофлорой. Также у этих пациентов отмечается нарушение продукции факторов мукозального иммунитета.

Ключевые слова: ВЭБ; ВГЧ 6-го типа; антимикробные пептиды; дефензины; кателицидин LL-37; лактоферрин; секреторный IgA

Статья поступила 18.09.2018. Принята в печать 16.11.2018.

Для цитирования: Щубелко Р.В., Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е., Андреев И.В., Авоян Г.Э., Сулова О.С. Рецидивирующие воспалительные заболевания ротоглотки – роль факторов мукозального иммунитета. Иммунология. 2019; 40 (1): 35–42. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11004.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Shchubelko R.V.¹, Zuikova I.N.², Shuljenko A.E.², Andreev I.V.³, Avoyan G.E.³, Surova O.S.³

Relapsing inflammatory diseases of the oropharynx – the role of mucosal immunity factors

¹ Multidisciplinary Medical Center "Clinic K+31", 119415, Moscow, Russia

² Department of allergology # 6 FSBI National research Center Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency, 115478, Moscow, Russia

³ Laboratory of Immunological Processes Modeling # 91 FSBI National research Center Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency, 115478, Moscow, Russia

Frequent relapses of inflammatory diseases of the upper respiratory tract (URT) – a condition that goes beyond purely otorhinolaryngological practice. Obviously, in such cases it is a violation of protective mechanisms at the system and/or local level. These patients are increasingly in the field of view of immunologists. Therefore, at the present stage it is necessary to understand both the etiopathogenetic state of this condition and the variants of the immunological dysfunction that forms in this group of patients.

The aim of this study was to determine the spectrum of the microbiological composition of the oropharynx and to investigate the factors of local immunity in patients with frequent recurrences of inflammatory diseases of the URT.

Material and methods. The bacterial microflora of the oropharynx was determined by sowing from throat, tonsils, the presence and concentration of herpes-group viruses in whole saliva (real-time PCR

Для корреспонденции
Щубелко Розалия Васильевна –
врач аллерголог-иммунолог
многопрофильного медицинского
центра «Клиника К+31»,
Москва, Россия
E-mail: spapharia@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-6993-9831>

For correspondence
Shchubelko Rosalia V. –
doctor allergist-immunologist,
Multidisciplinary Medical Center
"Clinic K+31", Moscow, Russia
E-mail: spapharia@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-6993-9831>

method). The concentration of protective factors of saliva (α -defensins, catelicidin LL-37, lactoferrin, secretory IgA) was also determined in patients with frequent recurrences of inflammatory diseases of the URT outside the exacerbation period.

Results. In a person who is often ill adults, the microbial landscape outside the period of exacerbation is represented by a combined bacterial (less pathogenic, mostly conditionally pathogenic) and viral (mainly EBV, HHV 6) microflora. Also in these patients there is a disturbance in the production of mucosal immunity factors.

Keywords: EBV; HHV 6; antimicrobial peptides; defensins; cationic LL-37; lactoferrin; secretory IgA

Received 18.09.2018. **Accepted** 16.11.2018.

For citation: Shchubelko R.V., Zuikova I.N., Shuljenko A.E., Andreev I.V., Avoyan G.E., Surova O.S. Relapsing inflammatory diseases of the oropharynx – the role of mucosal immunity factors. *Immunologiya*. 2019; 40 (1): 35–42. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11004. (in Russian)

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Орофарингеальная слизистая оболочка обеспечивает обработку огромного количества респираторных, пищевых, инфекционных и неинфекционных антигенов, с одной стороны, эффективно и быстро нейтрализуя потенциально опасные биологические субстанции, с другой – формируя толерантность к непатогенным организмам (комменсалам).

Защитные свойства слизистой ротоглотки реализуются особенностями ее структуры и организации. Она представлена многослойным неороговевающим эпителием, создающим плотный механический барьер для проникновения патогенов. Кроме того, слизистая ротоглотки оснащена хорошо развитым иммунологическим аппаратом, являясь зоной активности NALT (nasopharynx-associated lymphoid tissue), включающим как организованные тканевые структуры (миндалины, лимфоидные фолликулы), так и диффузную лимфоидную ткань. Благодаря NALT здесь осуществляются иммунные реакции врожденного и адаптивного иммунитета [1]. Смешанная слюна – еще одна характерная составляющая ротоглотки – играет важную роль в поддержании физико-химического гомеостаза ротовой полости, способствует реэпителизации поврежденной слизистой оболочки. Защитные факторы слюны (катионные белки, бактерицидные пептиды, ферменты, иммуноглобулины, муцины) являются активными участниками мукозального иммунитета [2].

Основные источники защитных протеинов в слюне – нейтрофилы, первые эффекторные клетки, попадающие в очаг воспаления. Защитные протеины присутствуют в слюне, как правило, в низких, клинически не значимых концентрациях. Однако, несмотря на это, они все же обеспечивают эффективную нейтрализацию патогенов: либо путем локального повышения их концентрации, либо благодаря одновременному воздействию разных защитных белков на один вид патогена. Защитные протеины слюны обладают антибактериальными, противовирусными и противогрибковыми свойствами – они могут связывать патогены, обеспечивая их агглютинацию и изоляцию на поверхности слизистой оболочки, или же непосредственно разрушать микробную мембрану. Эффекты различных компонентов слюны могут быть аддитивными и/или синергичными. Таким образом, активность защитных факторов слюны носит многофункциональный характер, что позволяет комбинировано воздействовать на антигены, обеспечивая их эффективную элиминацию [3].

Среди защитных факторов ротовой полости особое место занимают бактерицидные, или *антимикробные пептиды* (АМП). Они обладают широким спектром антимикробной активности, действуя против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжевых грибов и некоторых вирусов. В настоящее время стало ясно, что в ротовой полости АМП не только уничтожают патогенные микроорганизмы, но и участвуют в поддержании нормальной микрофлоры.

Известны 3 механизма разрушения клеточной мембраны антимикробными пептидами: «бочка», «тороидальная пора», «ковер» (рис. 1).

При достижении критической пороговой концентрации пептидов они агрегируются на мембране, что приводит к образованию трансмембранной поры, выстилаемой пептидом, который рассеивает протонные и ионные градиенты – модель «бочка»; в этом случае толщина и однородность мембраны не изменяются. В другом случае при критической концентрации пептида происходит изменение кривизны мембраны, она изгибается внутрь, что приводит к образованию поры, которая выстилается как пептидами, так и липидными группами – модель «тороидальная пора». Этот вариант приводит к уменьшению толщины мембраны и изменению однородности ее поверхности. Некоторые антимикробные пептиды связываются с фосфолипидными

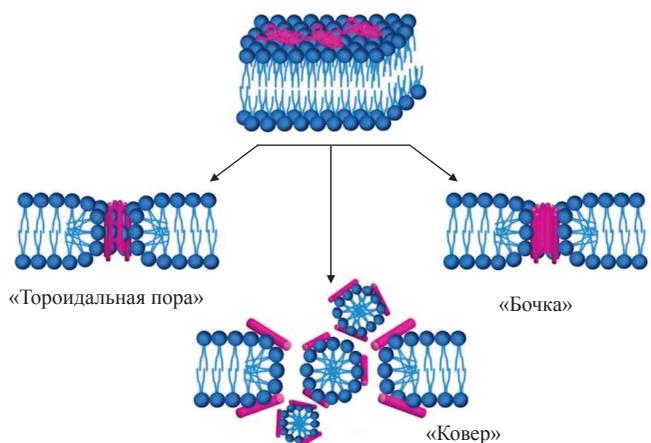


Рис. 1. Механизмы действия антимикробных пептидов [4]

группами электростатическими взаимодействиями и выравниваются параллельно поверхности мембраны наподобие ковра до достижения критической пороговой концентрации – модель «ковер». В дальнейшем происходит мицеллизация фрагментов мембраны и сильное снижение ее гомогенности [4].

Дефензины

Дефензины – катионные пептиды молекулярной массой 3–5 кДа. Обычно дефензины содержат около 30 аминокислотных остатков с характерным высоким содержанием аргинина и других основных аминокислот (лизина, гистидина), а также гидрофобных аминокислот (валина, лейцина, пролина). Основные и гидрофобные аминокислоты пространственно разобщены, что придает молекуле пептида амфипатичность.

Для дефензинов характерна β -складчатая, или шпилькообразная, глобулярная структура, стабилизируемая 3 внутримолекулярными дисульфидными мостиками, связывающими 6 цистеиновых аминокислот. В зависимости от расположения дисульфидных связей выделяют α -, β - и θ -дефензины. Для α -дефензинов характерно следующее распределение дисульфидных связей (указаны номера остатков цистеина, скрепляемых связью): 1–6, 2–4, 3–5. Связь между 1-м и 6-м остатками цистенина делает молекулу циклической. Эта цикличность не характерна для β -дефензинов, тогда как θ -дефензины образуют цикл за счет пептидной связи между крайними, а не цистеиновыми остатками [1].

В настоящее время охарактеризовано 6 групп α -дефензинов (HNP, human neutrophils peptides). Из них 4 группы (HNP-1–4) образуются в нейтрофилах, а еще 2 выделены из клеток Пеннета и обозначаются HD5 и HD6 (от Human Defensin). Все HNP организма человека выделяются из гранул нейтрофилов до созревания и дифференцировки клеток. У здорового человека HNP-1–3 наиболее обильно присутствуют в слюне (около 99%), уровень HNP-4 примерно в 100 раз ниже [5–7].

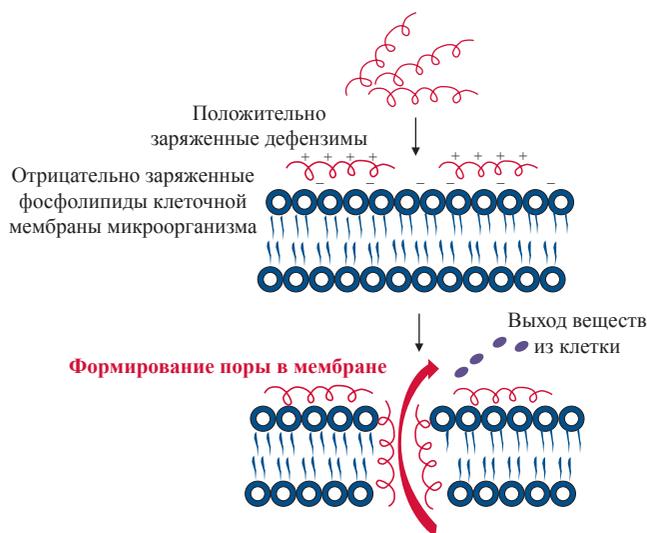


Рис. 2. Механизм действия дефензинов [5]

Семейство β -дефензинов (human Beta Defensin, hBD) содержит 6 членов (hBD-1-6), и все они в основном экспрессируются на эпителиальных клетках кожи и слизистых оболочек (ротовая полость, дыхательные пути, желудочно-кишечный и мочеполовой тракт, почки) [8].

Часть дефензинов синтезируется конститутивно, образование других молекул повышается в ответ на инфекцию или активный синтез провоспалительных цитокинов.

Как α -дефензины, так и β -дефензины имеют широкую антибактериальную активность, основанную на особенностях катионных пептидов, несущих положительный заряд. В отличие от эукариотических клеток, имеющих маленький заряд либо не имеющих его вовсе, мембраны бактериальных клеток заряжены отрицательно. Контакт дефензинов с клетками микроорганизмов не зависит от рецепторов и обусловлен электростатическими взаимодействиями положительно заряженных остатков собственных аминокислот с отрицательно заряженными группами [в составе пептидогликанов, липолисахаридов (ЛПС) и др.] на поверхности патогенов. Благодаря своему положительному заряду дефензины сначала адсорбируются на отрицательно заряженной мембране бактерии, затем агрегируются и интегрируются в липидный бислой (рис. 2).

В реализации следующей фазы взаимодействия дефензинов с патогеном решающая роль принадлежит амфипатичности их структуры: положительно заряженные группы продолжают контактировать с анионными молекулами клеточной стенки, а гидрофобные участки способствуют внедрению молекулы в клеточную мембрану патогена, что приводит к нарушению ее целостности. Интеграция дефензинов на поверхности мембраны содействует к формированию ионных каналов, трансмембранных пор, мембранных разрывов, результатом чего является гибель бактерии. На данный момент до конца не выяснено, как катионные пептиды (включая дефензины) проходят через полисахаридную капсулу бактерии и пептидогликановые слои мембраны, возможно, переваривание пептидогликанов лизоцимом слюны помогает им преодолеть этот барьер.

Кроме своей антибактериальной активности, дефензины также проявляют противогрибковые, противовирусные, иммуномодулирующие свойства, способствуя секреции определенных цитокинов, и являются хемотаксантами для дендритных клеток и Т-лимфоцитов [5, 7, 9].

Кателицидины

Кателицидины – положительно заряженные амфипатические пептиды. Единственный кателицидин человека носит название LL-37, так как он состоит из 37 аминокислотных остатков и содержит 2 остатка лейцина на N-конце. При нейтральных значениях pH пептид LL-37 заряжен положительно, и более половины его аминокислотных остатков неполярны. В водном растворе LL-37 образует беспорядочный клубок, но формирует

α -спираль при встраивании в двойной слой липидов биологических мембран. Способность образовывать α -спираль, по-видимому, и определяет антимикробную активность данного пептида. Механизм антимикробного действия кателицидина человека отличается от такового дефензинов [3, 5]. Предполагается, что LL-37 покрывает мембрану наподобие ковра и разрушает ее аналогично детергентам с образованием множества мицелл (рис. 3).

Этот пептид оказывает синергический антибактериальный эффект с дефензинами. Также LL-37 связывает и нейтрализует бактериальные ЛПС и, весьма вероятно, участвует в реэпителизации ран и язв в полости рта.

В смешанную слюну человеческий кателицидин выделяется нейтрофилами и в меньшей степени эпителиальными клетками. Синтез человеческого кателицидина в различных клетках регулируется факторами роста и дифференцировки и зависит от присутствия микроорганизмов. LL-37 проявляет антимикробную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Кателицидин LL-37 является хемоаттрактантом для иммунных клеток и вызывает миграцию нейтрофилов, моноцитов и Т-лимфоцитов в зону воспаления.

Некоторые исследователи считают, что человеческий кателицидин является сигналом тревоги (DAMP), и основная его функция – активация антиген-презентирующих клеток [3, 5, 10, 11].

Лактоферрин

Лактоферрин – связывающий ионы металлов катионный гликопротеин массой 80 кДа, состоит из одной полипептидной цепи (673 аминокислотных остатка), образующей 2 гомологичных домена, называемых N- и C-долями, в которых идентичны 40% остатков. Каждая доля содержит по одному железосвязывающему центру. Основными источниками лактоферрина слюны являются слюнные железы, нейтрофилы, клетки эпителия слизистой оболочки, жидкость десневой борозды. Лактоферрин – важная составляющая защитных механизмов слизистых оболочек благодаря способности связывать ионы железа, поддерживать кислую pH в очаге инфекции и воспаления и катионным свойствам, что позволяет ему оседать на негативно заряженных мембранах патогенов и связывать анионные молекулы (ДНК, гепарин, гликозамингликан). Лактоферрин активен против бактерий, грибов и вирусов. Лактоферрин является известным скавенджером (поглотителем) ионов железа, образует хелаты с ионами Fe^{3+} и создает их дефицит, лишая патогенную микрофлору микроэлемента, необходимого для ее пролиферации. Кроме того, многие микроорганизмы экспрессируют на своей поверхности рецепторы для лактоферрина; связывание его с такими рецепторами приводит к гибели микроорганизма, например, вследствие инициации процесса высвобождения липополисахаридов из клеточных стенок [1, 12, 13].

Как уже упоминалось, лактоферрин несет положительный заряд, благодаря чему он может связываться с мембранами клеток бактерий, разрушая их. Также лак-

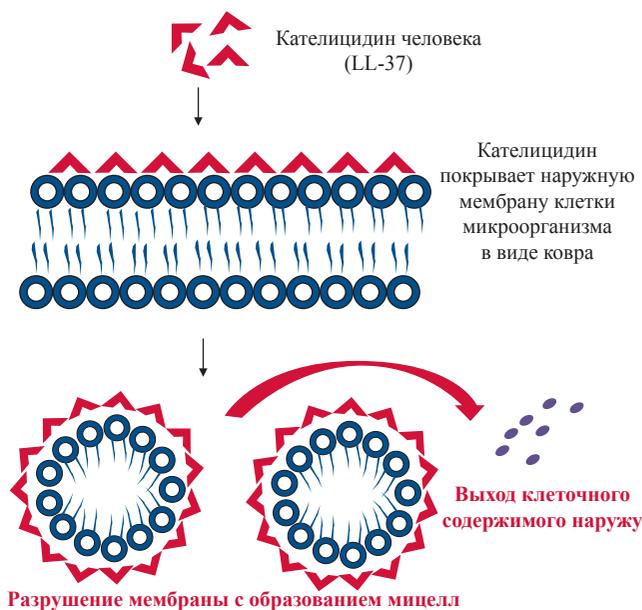


Рис. 3. Механизм действия кателицидина LL-37 [5]

тоферрин способен связывать адгезины бактериальных фимбрий, ингибируя эпителиальную адгезию определенных бактерий.

Противовирусная активность лактоферрина базируется на связывании (и блокировке) определенных клеточных гликозамингликанов, используемых вирусами при адсорбции. Это препятствует проникновению вирусных частиц в клетки микроорганизма. Также лактоферрин может нейтрализовать вирусы прямым связыванием либо путем блокировки клеточных рецепторов. Благодаря этим свойствам лактоферрин предотвращает развитие вирусной инфекции на ранней стадии [1, 12, 13].

Антитела в слюне

Специфические плазматиты NALT в основном секретируют димерные формы молекулы IgA и немного пентамерных IgM молекул, каждая из которых стабилизируется J-цепью. Оба типа иммуноглобулинов усваиваются из интерстиция и экспортируются в слюну через общие транспортные механизмы эпителия слюнных желез, утилизирующие полимерный иммуноглобулиновый рецептор (pIgR) и секреторный компонент (SC). Секреторный IgA (sIgA) и, возможно, секреторный IgM (sIgM) экскретируются в слюне конститутивно, при отсутствии стимуляции.

На базолатеральной поверхности эпителия J-цепь димерного/полимерного IgA и пентамерного IgM связывается с секреторным компонентом pIgR по принципу «ключ в замок», запуская молекулярный транспорт, который заканчивается экзоцитозом SC-связанных антител через апикальную поверхность клеток в просвет железы или ротовой полости. Процесс экзоцитоза сочетается с отщеплением секреторного компонента от pIgR, после чего остатки SC по-прежнему включаются

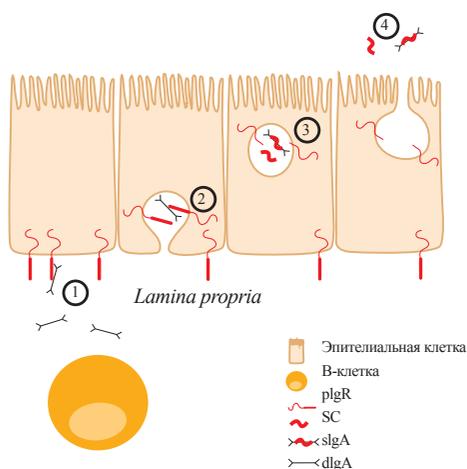


Рис. 4. Секреторный IgA. 1 – Димерный IgA связывается с полимерным иммуноглобулиновым рецептором (pIgR) в lamina propria. 2 – Эндоцитоз и трансцитоз комплекса dIgA + pIgR от базолатеральной к апикальной стороне эпителия слизистой оболочки. 3 – Внутриклеточное протеолитическое расщепление pIgR, создающее секреторный компонент (SC) и sIgA. 4 – Высвобождение SC и sIgA на поверхность слизистой оболочки [14]

в структуру sIgA и sIgM, наделяя секреторные иммуноглобулины устойчивостью против протеолитической деградации (рис. 4).

Свободные SC способны ингибировать эпителиальную адгезию некоторых бактерий, связывать фимбриальные адгезины бактерий, нейтрализовать некоторые бактериальные токсины. Кроме того, sIgA обладает мукофильными свойствами, что способствует закреплению его на слизистом слое слизистой оболочки. Секреторные иммуноглобулины слюны обеспечивают инактивацию патогенов: бактерий, грибов и вирусов, а также некоторых микробных токсинов, путем связывания и/или агглютинации их частиц, фиксируя их на поверхности и иммобилизируя до элиминации, предупреждая инвазию патогенов в подлежащие ткани. Связывание антигена и агглютинация также приводят к фагоцитозу (с последующей антигенной презентацией и лизисом) и к продукции цитокинов в присутствии иммунокомпетентных клеток: клеток Лангерганса, дендритных клеток, нейтрофильных гранулоцитов. Все иммуноглобулины независимо от их происхождения и антигенной специфичности способны индуцировать и катализировать образование озона, что приводит к эффективному микробному киллингу. Интересно, что не только полноценные иммуноглобулины способны катализировать реакцию, но и их фрагменты, и даже одиночные аминокислоты: триптофан, метионин, цистеин и гистидин. IgA слюны (секреторный и мономер) не способны непосредственно активировать систему комплемента, тогда как IgG слюны являются активатором комплемента [1, 12, 14].

Материал и методы

Цели настоящего исследования – определение спектра микробиологического состава ротоглотки и исследова-

дование факторов местного иммунитета у пациентов с частыми рецидивами воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей (ВДП).

Всего обследованы 40 пациентов, мужчин и женщин, которые обращались амбулаторно в клинику ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по поводу частых обострений хронических воспалительных заболеваний ВДП (фарингит, тонзиллит, тонзиллофарингит) – часто болеющие взрослые. В среднем частота обострений хронического фарингита/тонзиллита составила не менее 5 раз в год, средний показатель по группе – $7,1 \pm 2,1$ раза в год.

Группа сравнения состояла из условно здоровых лиц, не переносивших острых или обострений хронических заболеваний ВДП в течение 3 мес перед обследованием ($n = 20$).

Критерии исключения: признаки хронического тонзиллита токсико-аллергической формы II стадии, атрофическая и катаральная форма хронического фарингита, хронические риносинуситы, в том числе аллергической этиологии. Кроме того, в исследование не включали пациентов с множественным поверхностным или глубоким кариесом, курящих, а также женщин в период беременности или лактации.

Исследование спектра факторов мукозального иммунитета и бактериально-вирусной флоры ротоглотки проводили вне периода обострения хронических заболеваний ВДП.

Факторы мукозального иммунитета определяли в смешанной слюне, собранной утром натощак в стерильные контейнеры и доставленной в течение 2 ч с момента забора. Количественное определение дефензинов HNP1–3, кателицидина LL-37 и лактоферрина определяли иммуноферментным методом ELISA kit, производитель Нускулт Биотехнология (Н.В.Т.) В.В., Нидерланды (поставщик ЗАО «БиоХимМак», Россия). Количественно секреторный IgA определяли иммуноферментным методом ELISA kit Immundiagnostik AG, Германия (поставщик ЗАО «БиоХимМак», Россия).

Вирусную нагрузку определяли в смешанной слюне, собранной утром натощак в стерильные контейнеры и доставленной в течение 2 ч с момента забора. Выявление и количественное определение ДНК вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), вируса герпеса человека 6-го типа (ВГЧ 6), цитомегаловируса (ЦМВ) в биоматериале проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® EBV-скрин/монитор-FL», «АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL», «АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL» разработанных ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора в режиме реального времени с помощью прибора «Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System».

Забор биоматериала для микробиологического исследования проводили стерильным тупфером для взятия мазков (Sarstedt), собирали между дужками миндалин, по язычку и задней стенке глотки, не касаясь губ, щек и языка. Материал доставляли в термоконтейнерах в течение 2 ч с момента забора. Посев осуществляли на

нескольких питательных средах: кровяной агар с добавлением 5% крови крупного рогатого скота, на основе колумбийского агара (PRONADISA, Испания); уриселект (Bio-Rad, США); желточно-солевой агар (на основе солевого агара) и агар Сабуро (PRONADISA, Испания). Все посеы культивировали по стандартной методике при температуре 37,0 °С в течение 24–48 ч.

Тинкториальные свойства изучали путем окраски по Граму по общепринятой методике, в соответствии с инструкцией производителя. Биохимическую идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли с помощью полуавтоматического бактериологического фотометра BBL Crystal AutoReader (BD Biosciences); для дрожжевых грибов использовали среду Сабуро (производство фирмы PRONADISA, Испания), с последующей идентификацией на хромогенном агаре (PRONADISA, Испания), с ручной постановкой чувствительности к антимикотикам (производство Научно-исследовательский центр фармакотерапии – НИЦФ), труднокультивируемых грибов на автоматическом бактериологическом анализаторе VITEK® 2 COMPACT и на автоматическом микробиологическом анализаторе BD Phoenix 100 с последующим подтверждением и чувствительностью к антимикотикам; Slidex pneumokit – сенсibiliзироваанный латекс использовали для определения пневмококков (bioMerieux, Франция), оптохиновый тест, тест с желчью, определение каталазной активности (Bio-Rad, США). Гемолитическую активность культур изучали на агаре с добавлением 5% эритроцитов барана.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0. В процессе анализа полученных данных и проверки их на нормальность распределения установлено, что данные имеют характер распределения, отличный от нормального, поэтому для их статистической обработки использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых групп применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

В ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России амбулаторно обследовано 40 пациентов, мужчин и женщин, с частыми, не менее 5 раз в год, обострениями хронического воспаления ротоглотки (тонзиллиты/фарингиты), в возрасте от 18 до 60 лет. В контрольную группу вошли 20 пациентов, условно здоровых, не переносивших острых воспалительных заболеваний ВДП в течение 3 мес перед обследованием.

Основные жалобы пациентов исследуемой группы: дискомфорт в горле в виде першения, саднения, неловкости и/или жжения, боли при глотании («пустой глоток»), «простреливание» в ухо, ощущение крупинки на языке (пробок из миндалин), покалывание при глотании и разговоре, нерезкие болевые ощущения

в области регионарных лимфатических узлов и общая симптоматика – слабость, недомогание, субфебрилитет. Все указанные жалобы беспокоили пациентов в период обострения, однако могли сохраняться и в ремиссии, но с меньшей интенсивностью.

При исследовании микробного пейзажа ротоглотки исследуемых выяснилось, что встречаемость патогенных возбудителей в целом, как в группе с хроническими воспалительными заболеваниями ВДП вне периода обострения, так и в группе условно здоровых лиц, значительно ниже, чем выявляемость условно-патогенной флоры.

Наиболее частым представителем патогенной бактериальной флоры оказался *Staphylococcus aureus*, который выявлялся в 30% случаев у лиц исследуемой группы, в группе сравнения этот возбудитель выявлялся достоверно реже – в 15% случаев.

Доля другой патогенной микрофлоры, характерной для острых воспалительных процессов ротоглотки, невысока: *Streptococcus pneumoniae* – 2,5% случаев, *Pseudomonas aeruginosa* – 2,5%, энтеробактерии (*Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*) – 5,0%. В группе условно здоровых лиц патогенная микрофлора выявлена менее чем в 2% случаев. Грибковая флора (*C. albicans*) встречается в 3 раза чаще в исследуемой группе.

Наиболее часто в посевах из зева пациентов исследуемой группы обнаруживались представители β-гемолитических стрептококков группы В – *Streptococcus milleri group* (*Str. anginosus*, *Str. intermedius*, *Str. constellatus*, *Str. agalactiae*) и грамположительные α-гемолитические стрептококки – *Strept. anginosus group*, *Strept. sanguinis group*, *Strept. viridans*, тогда как в группе условно здоровых лиц чаще встречаются *Strept. mitis group*, *Strept. sanguinis group*. Таким образом, преобладающая микрофлора вне периода обострения как в исследуемой группе, так и в группе контроля представлена преимущественно условно-патогенной флорой, а патогенные микроорганизмы, характерные для острой фазы воспаления, встречаются крайне редко.

При изучении образцов смешанной слюны у пациентов исследуемой группы, установлена высокая частота обнаружения герпесвирусной инфекции – ДНК ВЭБ – 65% случаев, при этом в 55% случаев в сочетании с ДНК ВГЧ 6-го типа, и лишь в 10% случаев в виде моноинфекции. Выявление ДНК ВГЧ 6-го типа в виде моноинфекции наблюдалось в 30% случаев.

В группе сравнения герпесвирусы выявлялись значительно реже: ДНК ВЭБ в 20% случаев (в сочетании с ДНК ВГЧ 6-го типа в 15%, в виде моноинфекции в 5% случаев). ДНК ЦМВ не выявлялась в смешанной слюне пациентов исследуемой и контрольной групп. ДНК ВГЧ 6-го типа одинаково часто обнаруживалась как у пациентов с хронической рецидивирующей патологией ВДП, так и в группе условно здоровых лиц. Отсутствие вирусной репликации в слюне достоверно чаще встречалось в группе сравнения – в 40% случаев, по сравнению с 5% пациентов исследуемой группы ($p < 0,05$).

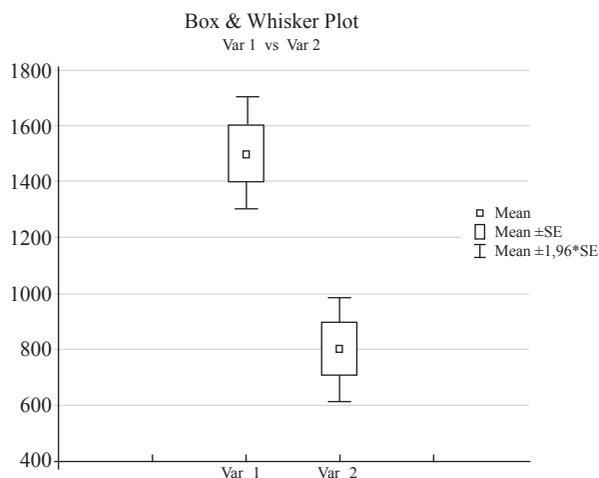


Рис. 5. Титры α-дефензинов (HNP1-3) в смешанной слюне пациентов исследуемой и контрольной групп. Var1 – группа контроля, Var2 – исследуемая группа

При количественной оценке выяснилось, что в исследуемой группе средняя концентрация вирусной нагрузки ВЭБ составила $4,55 \pm 0,95$ lg копий на 10^5 клеток человека (кл. чел.), что достоверно выше концентрации вирусов в группе условно здоровых лиц. Для ВГЧ 6-го типа средняя концентрация вирусной нагрузки составила $3,37 \pm 0,35$ lg копий на 10^5 кл. чел., что также выше средней концентрации этого патогена, чем в группе сравнения.

Таким образом, у часто болеющих взрослых микрофлора ротоглотки представлена сочетанием бактериальных и вирусных патогенов, которые в клинически значимых концентрациях определяются и вне периода обострения, что может способствовать снижению активности факторов местного иммунитета.

В реализации первой линии защиты в слизистых оболочках ротоглотки решающая роль принадлежит клеткам врожденного иммунитета, прежде всего воспалительным макрофагам – нейтрофилам. Нейтрофилы обладают высоким защитным потенциалом, осуществляемым главным образом в виде фагоцитоза. Помимо кислородзависимых факторов бактерицидности и ферментов, для эффективного функционирования нейтрофилов огромное значение имеют катионные белки (лизозим, лактоферрин, серпроцидины, ВР1-протеины) и антимикробные пептиды (дефензины, кателицидин).

Исследование антимикробных пептидов слюны часто болеющих взрослых показало достоверно более низкие титры в группе исследования по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Так, в среднем по группе контроля для α-дефензинов (HNP1–3) этот показатель составил $1500,88 \pm 100,95$ нг/мл, тогда как в исследуемой группе всего $801,50 \pm 95,59$ нг/мл (рис. 5).

Аналогичная тенденция прослеживается и в отношении кателицидина LL-37 – титры кателицидина в смешанной слюне пациентов в среднем по группе контроля составили $29,96 \pm 4,52$ нг/мл, а в исследуемой группе – $18,60 \pm 1,69$, $p < 0,05$ (рис. 6).

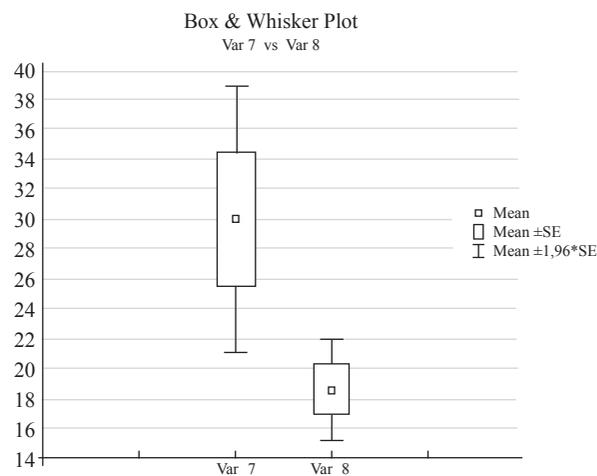


Рис. 6. Титры кателицидина LL-37 в смешанной слюне пациентов исследуемой и контрольной групп. Var7 – группа контроля, Var8 – исследуемая группа

Снижение титров антимикробных пептидов в группе часто болеющих взрослых свидетельствует о функциональной недостаточности эффекторных клеток врожденного иммунитета. Это может быть обусловлено постоянным присутствием смешанной бактериально-вирусной флоры с тенденцией к активации либо бактериального, либо вирусного компонента, постоянным поддержанием хронического очага воспаления и в связи с этим отсутствием возможности восстановления факторов мукозального иммунитета, вне периода обострения.

Лактоферрин, катионный белок, является важной составляющей системы неспецифической антимикробной защиты слизистых оболочек. Содержание этого белка в слюне больных должно быть значительно выше по сравнению со здоровыми лицами. Однако в нашем исследовании в отношении лактоферрина различия по группам неочевидны, и даже прослеживается тенденция к более высокой его концентрации в слюне контрольной группы – в среднем $899,77 \pm 62,80$ нг/мл, тогда как в исследуемой группе – $857,34 \pm 34,88$ нг/мл (рис. 7).

Такой неадекватный ответ на воспаление свидетельствует об истощении факторов врожденного иммунитета, что приводит к снижению резистентности слизистых оболочек на воздействие патогенов. Как и в случае с антимикробными пептидами (дефензины, кателицидин), к таким нарушениям приводит хронизация воспаления в ротоглотке, обусловленная персистирующей бактериально-вирусной флорой, что не дает возможности обновить и/или восстановить элементы мукозальной иммунной защиты и, как следствие, приводит к частым обострениям хронического воспаления – порочный круг замыкается.

Секреторный IgA – важнейший эффекторный фактор мукозальных лимфоидных тканей – отражает состояние адаптивного иммунитета слизистых оболочек. При исследовании титров sIgA в смешанной слюне выяснилось, что у большинства пациентов группы исследова-

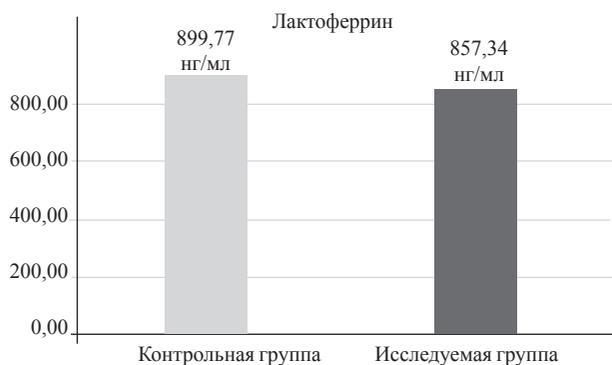


Рис. 7. Концентрация лактоферрина в смешанной слюне пациентов исследуемой и контрольной групп

ния (70%) уровень sIgA ниже, чем в группе контроля, и колеблется в пределах от $0,86 \pm 0,05$ до $1,30 \pm 0,03$ г/л, тогда как в группе контроля – $1,42 \pm 0,07$ г/л. Только у 30% пациентов исследуемой группы уровень sIgA достоверно выше, чем в контрольной группе, – $2,28 \pm 0,09$ г/л, и говорит о достаточной активности этого звена мукозального иммунитета (рис. 8).

Низкие титры sIgA у часто болеющих взрослых свидетельствуют об истощении гуморального звена вследствие недостаточности клеточных факторов местного иммунитета, в частности В-лимфоцитов – плазмоциты, продуцентов sIgA и Т-лимфоцитов – Th2-клеток. Выявленные нарушения, несомненно, вносят свой вклад в общую несостоятельность иммунитета слизистых оболочек.

Таким образом, у часто болеющих лиц наблюдается многоступенчатая недостаточность защитных факторов на уровне как врожденного (антимикробные пептиды, катионные белки), так и адаптивного (sIgA, В- и Th-лимфоциты) звеньев мукозального иммунитета.

Выводы

1. У часто болеющих взрослых микробный пейзаж вне периода обострения представлен сочетанной бактериально-вирусной микрофлорой: условно-патогенными, очень редко, патогенными бактериями (в основном *Staphylococcus aureus*) и представителями герпес-группы (преимущественно, ВЭБ, ВГЧ 6), что может играть роль в хронизации воспаления в ротоглотке,

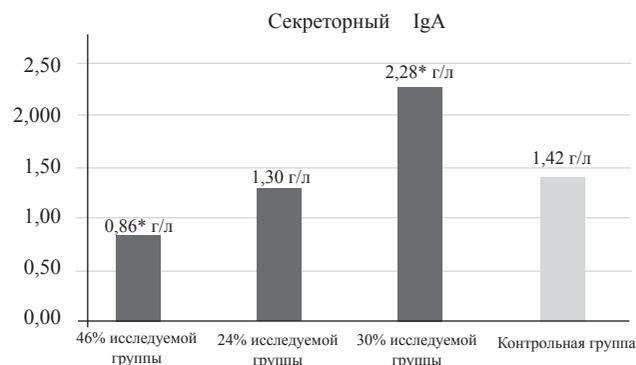


Рис. 8. Титры sIgA в смешанной слюне пациентов исследуемой и контрольной групп

способствовать снижению местного иммунитета и приводить к частым обострениям патологии ВДП.

2. Наиболее часто в смешанной слюне исследуемой группы по сравнению с другими герпесвирусами и с группой условно здоровых лиц встречается ДНК ВЭБ, что может указывать на его роль в поддержании воспаления и/или усугублении агрессивного действия бактериальной микрофлоры. ДНК ВГЧ 6-го типа одинаково часто выявляется в обеих группах, поэтому его значение в хронизации воспаления ротоглотки до конца не выяснено.

3. В смешанной слюне часто болеющих взрослых отмечаются низкие уровни факторов мукозального иммунитета по сравнению с условно здоровыми лицами: антимикробных пептидов (α -дефензинов, кателицидина), лактоферрина и секреторного IgA, – что свидетельствует об иммунологической несостоятельности механизмов иммунной защиты, ассоциированной, по всей видимости, с персистирующей бактериально-вирусной флорой.

4. Лечение пациентов с часто рецидивирующими воспалительными заболеваниями ВДП должно предусматривать комплексный подход: воздействие на этиологическое звено процесса (бактериально-вирусное) и коррекцию мукозального иммунитета слизистых оболочек. Такая стратегия позволит разорвать порочный круг хронического воспаления, обеспечит адекватный иммунный ответ на местном уровне и снизит частоту рецидивов воспаления в ротоглотке.

Литература

1. Ярилин А.А. Иммунология : учебник. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010.
2. Fábíán K.T., Hermann P., Beck A., Fejérdy P. et al. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 4295–320.
3. Khurshid Z., Naseem M., Sheikh Z., Najeeb S. et al. Oral antimicrobial peptides: types and role in the oral cavity. *Saudi Pharm. J.* 2016; 24: 515–24.
4. Silva P.M., Gonçalves S., Santos N.C. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 97.
5. Вавилова Т.П., Деркачева Н.И., Островская И.Г. Антимикробные пептиды – многофункциональная защита тканей полости рта. *Рос. стоматология.* 2015; 3: 3–12.
6. Мамчур В.И., Левых А.Э. Дефензины – эндогенные пептиды с антиинфекционными и противоопухолевыми свойствами. *Таврический мед.-биол. вестн.* 2012; 15 (2): 315–21.
7. Kamekura R., Imai R., Takano K., Yamashita K. et al. Expression and localization of human defensins in palatine tonsils. *Adv. Otorhinolaryngol.* 2016; 77: 112–8.

8. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Дефензины – мультфункциональные катионные пептиды человека. Иммунология, аллергология, инфектология. 2008; 2: 31–40.

9. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*. 2014; 7: 545–94.

10. Smet K., Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.* 2005; 27: 1337–47.

11. Dale B.A., Fredericks L.P. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2005; 7 (2): 119–33.

12. Fábíán T.K., Hermann P., Beck A., Fejérdy P. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 4295–320.

13. Berlutti F., Pantanella F., Natalizi T. et al. Antiviral properties of lactoferrin – a natural immunity molecule. *Molecules*. 2011; 16: 6992–7018.

14. Turula H., Wobus C.E. The role of the polymeric immunoglobulin receptor and secretory immunoglobulins during mucosal infection and immunity. *Viruses*. 2018; 10 (5): 237.

■ References

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

2. Fábíán K.T., Hermann P., Beck A., Fejérdy P. et al. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 4295–320.

3. Khurshid Z., Naseem M., Sheikh Z., Najeeb S. et al. Oral antimicrobial peptides: types and role in the oral cavity. *Saudi Pharm. J.* 2016; 24: 515–24.

4. Silva P.M., Gonçalves S., Santos N.C. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Front Microbiol.* 2014; 5: 97.

5. Vavilova T.P., Derkacheva N.I., Ostrovskaya I.G. Antimicrobial peptides – multifunctional protection of oral tissues. *Rossiyskaya stomatologiya*. 2015; (3): 3–12. (in Russian)

6. Mamchur V.I., Leviev A.E. Defensins are endogenous peptides with anti-infectious and antitumor properties. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskiy vestnik*. 2012; 15 (2): 315–21. (in Russian)

7. Kamekura R., Imai R., Takano K., Yamashita K., Jitsukawa S. et al. Expression and localization of human defensins in palatine tonsils. *Adv. Otorhinolaryngol.* 2016; 77: 112–8.

8. Budigina A.S., Pинегин B.V. Defensins are multifunctional human cationic peptides. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya*. 2008; (2): 31–40. (in Russian)

9. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*. 2014; 7: 545–94.

10. Smet K., Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.* 2005; 27: 1337–47.

11. Dale B.A., Fredericks L.P. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2005; 7 (2): 119–33.

12. Fábíán T.K., Hermann P., Beck A., Fejérdy P. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 4295–320.

13. Berlutti F., Pantanella F., Natalizi T. et al. Antiviral properties of lactoferrin – a natural immunity molecule. *Molecules*. 2011; 16: 6992–7018.

14. Turula H., Wobus C.E. The role of the polymeric immunoglobulin receptor and secretory immunoglobulins during mucosal infection and immunity. *Viruses*. 2018; 10 (5): 237.

© Гудима Г.О., Хаитов Р.М., 2019

Гудима Г.О., Хаитов Р.М.

Молекулярно-биологические подходы к терапии ВИЧ-инфекции. Перспективы применения технологий редактирования генома для элиминации ДНК ВИЧ-1 из инфицированных клеток

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115478, Москва, Россия

Антиретровирусная терапия (АРТ) способна эффективно снижать уровень вирусной нагрузки в плазме крови ВИЧ-инфицированных пациентов, однако вирус, скрытый в латентных резервуарах, недоступен для ее действия и обеспечивает персистенцию инфекции. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка способов воздействия на провирусную ДНК, интегрированную в геном клетки-хозяина. В обзоре рассматриваются перспективные стратегии применения технологий редактирования генома для мутагенной деактивации генов вируса, удаления интегрированной ДНК ВИЧ-1 из генома клетки-мишени, а также ликвидации латентного резервуара инфекции.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; антиретровирусная терапия; генотерапия; редактирование генома; рекомбиназа; CRISPR/Cas9; обзор

Статья поступила 17.10.2018. Принята в печать 16.11.2018.

Для цитирования: Гудима Г.О., Хаитов Р.М. Молекулярно-биологические подходы к терапии ВИЧ-инфекции. Перспективы применения технологий редактирования генома для элиминации ДНК ВИЧ-1 из инфицированных клеток. Иммунология. 2019; 40 (1): 44–51. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11005.

Финансирование. Работа не имела спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Гудима Георгий Олегович –
доктор биологических наук,
профессор, ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии» ФМБА
России, Москва, Россия
E-mail: goudima@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2864-6949>

Gudima G.O., Khaitov R.M.

Molecular biological approaches to HIV infection therapy. Perspectives of usage of genome editing technologies for HIV DNA elimination from infected cells

NRC Institute of Immunology, FMBA, Moscow, Russia

Antiretroviral therapy (ART) is able to effectively reduce the plasma viral load in HIV-infected patients. However virus hidden in latent reservoirs is inaccessible for ART and supports the persistence of infection. So the development of approaches to affect the proviral DNA integrated in host cell genome is of great importance. Perspective strategies of the genome editing technologies for mutagenic deactivation of viral genes, HIV DNA removal from host cell genome and also for latent viral reservoir eradication are being analysed in the review.

Keywords: HIV-infection; antiviral therapy; gene therapy; genome editing; recombinaise; CRISPR/Cas9; review

Received 17.10.2018. Accepted 16.11.2018.

For citation: Gudima G.O., Khaitov R.M. Molecular biological approaches to HIV infection therapy. Perspectives of usage of genome editing technologies for HIV DNA elimination from infected cells. Immunologiya. 2019; 40 (1): 44–51. 10.24411/0206-4952-2019-11005. (in Russian)

Acknowledgments. The work had no sponsorship.

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

For correspondence
Gudima Georgii O. –
PhD, Professor, NRC Institute
of Immunology FMBA,
Moscow, Russia
E-mail: goudima@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2864-6949>

Основным препятствием для удаления ВИЧ-1 из организма инфицированного человека является латентный вирусный резервуар, который существует даже при долго-временной антиретровирусной терапии (АРТ) и недоступен для химиопрепаратов. Удаление провирусной ДНК из инфицированных клеток рассматривается как принципиально важный подход к лечению ВИЧ-инфекции.

Этот подход был исследован с применением рекомбиназ (ферментов, способных к сайт-специфическому изменению расположения нуклеотидных последовательностей ДНК) [1], цинк-пальцевых нуклеаз ZFN (Zinc Finger Nucleases) и нуклеаз TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), несущих ДНК-связывающие модули, которые распознают последовательности ДНК ВИЧ-1

[2–4]. Разработка технологии применения бактериальной противовирусной системы CRISPR/Cas9 для редактирования генов в клетках млекопитающих привела к интенсивным исследованиям, посвященным использованию этой системы для блокирования и элиминации вирусных инфекций, в том числе ВИЧ-инфекции [5–7].

CRISPR (сгруппированные регулярно расположенные палиндромные повторы, Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) – особые локусы простейших, состоящие из повторяющихся последовательностей, которые разделены уникальными последовательностями-спейсерами. Спейсеры содержат чужеродные генетические фрагменты, с которыми сталкивалась клетка. РНК, транскрибирующиеся с локусов CRISPR, совместно с ассоциированными белками Cas (CRISPR-associated) обеспечивают защиту клеток простейших от вирусов или плазмид за счет комплементарного связывания РНК с нуклеиновыми кислотами чужеродных элементов и последующего разрушения их белками Cas [5, 6].

Cas9 представляет собой эндонуклеазу, которая расщепляет двухцепочечную ДНК в специфических последовательностях. Cas9 формирует комплекс с одноцепочечной направляющей РНК (single guide RNA, sgРНК), 20 первых нуклеотидов которой комплементарно соединяются с последовательностью-мишенью ДНК [8]. Кроме sgРНК, Cas9 должна распознать мультинуклеотидный участок, прилегающий к 3'-концу ДНК-мишени, который называется PAM (Protospacer Adjacent Motif). Затем нуклеазный домен Cas9 осуществляет сайт-специфическое разрезание ДНК [9]. Разрезание ДНК индуцирует образование мутаций (делеций, вставок или замен), которые возникают в процессе репарации ДНК [10]. Синтезированы sgРНК, направляющие Cas9 к различным участкам ДНК ВИЧ-1, которые содержат структурные и регуляторные гены или LTR вируса. Их применение вызывало выраженную супрессию продукции ВИЧ-1 и распространения инфекции в различных типах клеток, в том числе первичных CD4⁺-Т-клетках и CD4⁺-Т-клеточных линиях [11–16].

Технологии генного редактирования и модуляции транскрипции генов на основе комплекса CRISPR/Cas9 рассматриваются в качестве перспективных стратегий генотерапии ВИЧ-инфекции и интенсивно исследуются. Основными направлениями терапевтического применения комплекса CRISPR/Cas9 являются предотвращение интеграции провирусной ДНК в геном клетки-мишени, вырезание интегрированной ДНК ВИЧ из генома клетки-мишени или мутагенная деактивация генов вируса, а также регуляция экспрессии клеточных факторов, необходимых для проникновения и репликации ВИЧ [17–19].

1. Система CRISPR/Cas9 – инструмент генного редактирования и модуляции транскрипции

CRISPR индуцирует направленные мутации ДНК и способствует защите бактерий от патогенных вирусов и плазмид [20, 21]. В 2012 г. была разработана модифицированная система CRISPR, включающая короткие

sgРНК и нуклеазу Cas9 *Streptococcus pyogenes* [22]. Эта упрощенная система может быть адаптирована к распознаванию целевых последовательностей ДНК практически любого организма, что определяет широту ее функционального применения [5, 6, 23]. Состоящая из 17–20 нуклеотидов sgРНК связывается с целевой последовательностью ДНК, а нуклеаза Cas9, направляемая этой sgРНК, катализирует расщепление ДНК. С помощью направленного мутагенеза в эндонуклеазных доменах получена деактивированная Cas9 (dCas9), что позволило разработать программируемые РНК-зависимые ДНК-связанные белки [24, 25]. Соединение dCas9 с аксессуарными белками – активаторами или супрессорами транскрипции – позволяет осуществить РНК-направляемое целевое регуляторное воздействие на определенные локусы ДНК, в том числе и на провирусную ДНК ВИЧ [24–29].

Провирус ВИЧ с двух концов содержит идентичные LTR-участки. Комплекс CRISPR/Cas9, направленный против LTR, индуцирует разрезание ДНК в этих участках с обоих концов провируса. Процесс восстановления ДНК в удаленных участках между точками разрезания позволяет выявить расположение провируса в геноме хозяина [11, 29, 30]. Целевые sgРНК, направленные к нескольким сайтам 5'-LTR, способны привести к потере промоторной активности этого участка и деактивации провируса [29]. Также sgРНК могут быть направлены к специфическим вирусным рамкам считывания, что приводит к появлению вставок и/или делеций, которые изменяют функциональность белков вируса, и, как следствие, вызывают нарушение образования новых вирионов [13].

Преимуществом системы CRISPR/Cas9 является легкость «программирования» sgРНК, которая экспрессируется независимо от Cas9 (или dCas9). Множественные sgРНК способны взаимодействовать со множественными целевыми участками ДНК при одновременной экспрессии одного и того же белка Cas9. Таким образом, система CRISPR/Cas9 может рассматриваться как потенциальное средство редактирования вирусных генов и модуляции их активности. Постоянное совершенствование позволило снизить количество ошибок системы CRISPR/Cas9 практически до нуля [31].

С помощью системы CRISPR/Cas9 удалось с высокой точностью удалить из латентно ВИЧ-инфицированных культивируемых CD4⁺-Т-клеток человека участок интегрированной провирусной ДНК между 5'- и 3'-LTR. Полногеномное секвенирование не выявило никаких нарушений целостности клеточного генома после взаимодействия с CRISPR/Cas9. Клетки сохраняли жизнеспособность и функциональную активность. Персистирующая коэкспрессия Cas9 и специфических целевых sgРНК в очищенных от вирусного генома Т-клетках обеспечивала их защиту от повторной инфекции ВИЧ-1. Введение CRISPR/Cas9 с помощью лентивирусного вектора значительно снижало репликацию вируса в ВИЧ-инфицированных первичных CD4⁺-Т-клетках человека *in vitro* и существенно уменьшало уровень вирусной нагрузки в культурах CD4⁺-Т-клеток ВИЧ-инфицированных

пациентов *ex vivo* [15]. Генное редактирование с применением системы CRISPR/Cas9 рассматривается как основа подхода к элиминации ДНК провируса ВИЧ-1 из инфицированных CD4⁺-Т-клеток и потенциально эффективной стратегии лечения ВИЧ-инфекции/СПИДа.

2. CRISPR/Cas9-опосредованная реактивация латентного ВИЧ-1

Ген-специфическая активация транскрипции была достигнута с использованием различных вариантов CRISPR/Cas9. Исходные комплексы включали dCas9, соединенную с С-концевым доменом активации транскрипции вируса герпеса (VP16 или VP64), для модуляции эндогенной экспрессии генов. Совместное действие белков слияния dCas9-VP16, dCas9-VP64 и sgРНК приводило к высокоспецифическому усилению экспрессии целевых генов [24, 26–28, 32]. Активация транскрипции усиливалась при использовании множественных непрерывающихся sgРНК, направленных к одному и тому же промотору, что приводило к рекрутированию нескольких копий dCas9-VP64 [26–28, 32]. Применение множественных активационных доменов в сочетании с одной молекулой dCas9 также усиливало РНК-опосредованную активацию транскрипции [33]. В этом случае использовалась полипептидная конструкция SunTag, которая обеспечивала рекрутирование нескольких доменов VP64 к комплексу sgРНК/dCas9, локализованному на промоторе целевого гена. На примере генов рецептора CXCR4 и ингибитора клеточного цикла CDKN1B было показано, что применение платформы SunTag позволяет усиливать активацию гена с помощью одной sgРНК [33].

На основе взаимодействия Cas9 с аптамерами РНК (короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулами различной природы [34]), которые селективно связывались с димеризованными белками оболочки бактериофага MS2, были сконструированы активационные комплексы – синергичные медиаторы активации (synergistic activation mediator, SAM), позволяющие использовать различные активационные домены. В частности, включение в состав SAM белков слияния MS2 с р65-субъединицей NF-κB и активационным доменом HSF1 приводило к значительному усилению транскрипции, опосредуемой соответствующей sgРНК [35].

Направляемая sgРНК активация генов с использованием CRISPR/Cas9 представляет собой новый перспективный подход к целевой индукции транскрипции в латентных резервуарах ВИЧ-1. К числу наиболее важных факторов, влияющих на активацию ВИЧ-1, относится расположение целевого сайта, с которым связывается sgРНК, по отношению к сайту начала транскрипции (transcription start site, TSS). Обычно сайт связывания sgРНК находится в районе от –200 до +1 нп относительно TSS [35, 36]. Дальнейшие усилия направлены на разработку сочетаний sgРНК, взаимодействующих с последовательностями промотора 5'-LTR, и достижение синергичной высокоэффективной активации. Несмотря на то, что новая технология представляется многообещающей, необходимы дальней-

шие исследования, связанные с различной локализацией латентных резервуаров провируса. В частности, важный латентный резервуар находится в центральной нервной системе. Он компартментализован, труднодоступен для антиретровирусных препаратов и иммунного надзора.

3. Система CRISPR/Cas9 и редактирование локуса гена CCR5

Для входа в клетку-мишень ВИЧ-1 требуется рецептор CD4 и корецепторы CCR5 или CXCR4 [37]. Воздействие на гены *CD4* и *CXCR4* нежелательно, так как эти рецепторы жизненно важны для нормального функционирования иммунной системы [38]. CCR5 является мишенью действия антиретровирусного препарата маравирик. Индивидуумы, несущие мутацию *CCR5Δ32* в гомозиготе, обладают естественной устойчивостью к инфекции R5-тропными штаммами ВИЧ-1 [39, 40]. Пересадка костного мозга от донора, гомозиготного по аллелю *CCR5Δ32*, позволила впервые вылечить ВИЧ-инфицированного пациента (единственный подтвержденный случай излечения от ВИЧ-инфекции) [41–43]. До сих пор, однако, не подтверждено, что при этом произошло удаление ВИЧ-1 из латентных резервуаров. Существует вероятность, что пересадка костного мозга дала эффект функционального лечения, в результате которого ВИЧ-1, появляющийся из латентных резервуаров, адекватно контролируется функциональной, хотя и генетически модифицированной, иммунной системой. Однако аллогенная трансплантация костного мозга вряд ли имеет перспективы широкого применения для лечения ВИЧ-инфекции, так как число потенциальных доноров, несущих мутацию *CCR5Δ32* в гомозиготном состоянии, невелико (3–5% европейской популяции) [44, 45]. Кроме того, подбор HLA-совместимого донора и сложный процесс инактивации собственного костного мозга также обуславливают невозможность широкомасштабного применения этого подхода. Интенсивные исследования направлены на генерацию гомозиготных мутаций гена *CCR5* с использованием набора программируемых нуклеаз и модификации CD34⁺-стволовых клеток-предшественников или CD4⁺-Т-клеток пациента *ex vivo*.

В моделях ВИЧ-инфекции на животных CCR5-специфические ZFN удавалось успешно доставлять в первичные CD34⁺-гемопозитические стволовые клетки-предшественники [46, 47] или CD4⁺-Т-клетки [48], которые затем пересаживались мышам. В большинстве случаев *ΔCCR5*-клетки имели продолжительное время персистенции и селективно выживали в присутствии вируса. В клинических исследованиях аденовирусный вектор, экспрессирующий CCR5-специфическую ZFN, использовался для трансфекции CD4⁺-Т-клеток, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов [49]. После размножения *ex vivo* трансфицированные клетки были реинфузированы аутологично. Генномодифицированные клетки детектировались у всех участников исследования до 42 мес. У пациентов, которые прерывали АРТ, обнаруживалось селективное выживание генномодифицированных клеток. Снижение

вирусной нагрузки коррелировало со степенью биаллельного удаления *CCR5*.

Технология CRISPR/Cas9 представляет собой серьезную альтернативу подходам, основанным на применении ZFN или TALEN для разрушения гена *CCR5*, так как она легче в использовании, требует одного варианта sgPНК для локализации сайта расщепления и обеспечивает более высокий уровень специфичности к мишени. Показано, что значимые разрушения в последовательности гена *CCR5* могут быть индуцированы, когда клетки были котрансфицированы плазмидами, кодирующими Cas9 и определенной sgPНК [50]. При использовании сочетания TALEN или CRISPR/Cas9 с транспозоном piggyBac удалось воспроизвести природную делецию *CCR5Δ32* в стимулированных полипотентных стволовых клетках. Модифицированные стволовые клетки дифференцировались в моноциты/макрофаги, которые устойчивы к инфицированию ВИЧ-1 [51]. Для модификации CD4⁺-Т-клеток использовали лентивирусные векторы, экспрессирующие Cas9 и *CCR5*-специфическую sgPНК. Хотя в культивируемых клеточных линиях разрушение гена *CCR5* происходило с высокой частотой, те же системы трансдукции приводили к токсическому эффекту [52]. Возможно, это было связано с взаимодействием *CCR5*-sgPНК с последовательностями в других генах, например, с геном *CCR2*, последовательность которого сходна с последовательностью гена *CCR5* [53, 54]. Следует принимать во внимание и возможность неблагоприятных эффектов, обусловленных реакцией системы врожденного иммунитета на чужеродную ДНК [55]. Отчасти они компенсируются добавлением мPНК, транскрибированной *in vitro* [56]. Система CRISPR/Cas9 была применена для воздействия на гены *CCR5* и *B2M* в первичных CD4⁺-Т-клетках и CD34⁺-гемопозитических стволовых клетках-предшественниках. При использовании двух sgPНК различной специфичности удалось достичь эффективного биаллельного разрушения гена *CCR5* в клетках обоих типов. Как и модифицированные полипотентные стволовые клетки, модифицированные гемопозитические клетки-предшественники сохраняли способность к мультилинейной дифференцировке *in vitro* и *in vivo* при трансплантации мышам [57].

Кроме корцептора *CCR5*, важными терапевтическими мишенями могут служить и другие белки человека, необходимые для входа вируса в клетку. Широкогеномный скрининг с использованием системы CRISPR позволил выявить ряд факторов организма-хозяина, связанных с ВИЧ-инфекцией. Белки TPST2 (тирозил-протеин-сульфотрансфераза 2) и SLC35B2 (белок В2 семейства растворимых переносчиков 35) обеспечивают сульфатирование внеклеточных остатков тирозина молекулы корцептора *CCR5*, что облегчает его распознавание комплексом Env вируса. Молекула адгезии активированных лейкоцитов ALCAM опосредует агрегацию лимфоидных клеток, которая необходима для межклеточной передачи ВИЧ. С помощью комплекса

CRISPR/Cas9 и антител в культуре первичных CD4⁺-Т-клеток человека удалось блокировать активность этих белков, что позволяет рассматривать их как возможные мишени молекулярно-генетического терапевтического воздействия [58].

4. Модуляция антисмысловых длинных некодирующих PНК ВИЧ-1 с помощью CRISPR/Cas9

Важная роль в регуляции активности провирусной ДНК ВИЧ-1 принадлежит длинной антисмысловой некодирующей PНК (lncPНК), транскрибируемой с гена *nef*, расположенного на 3'-конце вирусного генома [59–62]. Сверхэкспрессия *nef* вызывает супрессию транскрипции генов вируса, а подавление синтеза *nef* приводит к активации экспрессии генов ВИЧ-1 [62].

Промоторный участок антисмысловой lncPНК *nef* расположен внутри участка гена *nef*, который подвергается делеции в штаммах вируса, выделенных в корте элитных контроллеров [60, 63]. Этот же участок чувствителен к подавлению транскрипции, опосредованному miPНК. Подавление образования антисмыслового транскрипта с помощью miPНК приводило к активации экспрессии генов вируса [62]. Высказано предположение, что lncPНК *nef* способствует переходу вируса в латентное состояние. В таком случае промоторный участок гена *nef* является перспективной мишенью для CRISPR/Cas9-опосредованного подавления активности или разрушения [62]. Редактирование промоторных элементов *nef* с помощью системы CRISPR/Cas9 может привести к воспроизведению делеций, обнаруженных в штаммах ВИЧ-1, выделенных от элитных контроллеров. Мутации в промоторном участке гена *nef* способны нарушить активацию вируса в результате продукции укороченных транскриптов и неполноценных укороченных вирусных белков. Такой подход требует дальнейшего исследования. В частности, необходимо идентифицировать консервативные lncPНК вируса и хозяина, которые служили бы терапевтической мишенью для воздействия CRISPR/Cas9.

Разработка системы CRISPR/Cas9 существенно продвинула возможности изменения генома и контроля экспрессии генов. Также CRISPR/Cas9 представляет перспективную технологию для разработки новых терапевтических подходов.

Развитие ВИЧ-инфекции может быть заблокировано путем направленного воздействия на интегрированную провирусную ДНК [13, 29], а также в результате подавления экспрессии факторов хозяина, например, корцептора *CCR5* [50, 51, 53, 64]. Направленное разрезание в LTR-участках может привести к удалению ДНК провируса из генома хозяина [11–13]. Применение множественных sgPНК предложено для разрушения генов ВИЧ, что способно предотвратить синтез вирусных белков, формирование и высвобождение новых вирионов [13]. Воздействие на регуляторные последовательности с помощью активаторов на основе системы CRISPR/Cas9

позволяет стимулировать репликацию ВИЧ в латентных резервуарах. В результате ВИЧ становится доступным для воздействия АРТ.

Применение технологии CRISPR/Cas9 для блокирования интеграции и прогрессирующей инфекции, а также для инактивации или удаления провируса находится в стадии проверки концепции. Есть весомые основания предполагать, что с помощью этой технологии можно будет эффективно удалять вирус, скрытый в латентных резервуарах. Применение активаторов, основанных на CRISPR/Cas9, представляет собой перспективный подход для специфической целевой реактивации латентно инфицированных вирусных резервуаров с последующей элиминацией реплицирующего вируса с помощью АРТ. Кроме того, с помощью CRISPR/Cas9-редактирования появилась возможность генерировать делеции гена *CCR5*, воспроизводящие природную гомозиготную мутацию *CCR5Δ32*, и таким образом индуцировать перманентную защиту клеток от ВИЧ-инфекции. Хотя еще существует много препятствий, в том числе вопросы безопасности и технические аспекты, связанные с доставкой векторов экспрессии, технология CRISPR/Cas9 представляется перспективным подходом к реальному удалению ВИЧ-1 из инфицированного организма.

5. Ограничения потенциального терапевтического применения системы CRISPR/Cas9

Несмотря на многообещающую перспективу использования системы CRISPR/Cas9 для инактивации или даже удаления ДНК провируса из ВИЧ-инфицированных клеток, остается важный вопрос: способен ли ВИЧ-1 уходить от действия CRISPR/Cas9, и если да, то каким образом? Этот вопрос является фундаментальным для стратегий, направленных на лечение и превенцию ВИЧ-инфекции с использованием генотерапии [19].

Важные данные были получены при исследовании эволюции ВИЧ-1 в CD4⁺-Т-клетках, которые стабильно экспрессировали Cas9 и sgРНК, связывающиеся с различными участками генома ВИЧ-1 [65, 66]. В краткосрочных экспериментах наблюдалось выраженное ингибирование репликации вируса, но через продолжительное время обнаруживалась продуктивная инфекция. Быстрый уход от ингибирующего действия наблюдался, когда комплекс sgРНК и Cas9 был специфичен к менее консервативным последовательностям ДНК ВИЧ-1, а если воздействие было направлено против более консервативных последовательностей, время образования *escape*-мутантов увеличивалось [65]. На основании представлений о механизме ухода ВИЧ-1 от воздействия специфической РНК-интерференции можно было ожидать изменения последовательности ДНК ВИЧ-1, которая является мишенью sgРНК, или последовательности PAM [67–69]. Выявлены мутации, которые нарушали процесс узнавания sgРНК соответ-

ствующих мишеней. Затем были получены неожиданные результаты. Большинство устойчивых мутаций были кластеризованы в участке, против которого была направлена расщепляющая активность Cas9, хотя сайт связывания sgРНК имел размеры значительно больше. Другой особенностью стала частая встречаемость вставок и делеций, по крайней мере, в менее консервативных участках последовательностей-мишеней. Предполагается, что эти мутации появляются не из-за ошибок обратной транскрипции, а представляют собой результат негомологичного соединения концов (*non-homologous end joining*, NHEJ) – клеточного механизма, который используется для репарации разрывов ДНК. Глубокое секвенирование показало, что ряд мутаций в *escape*-вариантах вируса действительно появились в ДНК провируса в CD4⁺-Т-клетках в течение 36 ч после ВИЧ-инфекции [66]. После индуцированного sgРНК расщепления ДНК провируса под действием Cas9 механизм NHEJ приводит к образованию мутаций в сайте расщепления. Некоторые мутации блокируют функциональную активность вирусной ДНК и не закрепляются отбором, но другие могут обеспечивать устойчивость вируса к действию комплекса sgРНК/Cas9 за счет изменения последовательности-мишени ДНК. Если мишенями служат консервативные последовательности, мутации в результате вставок/делеций/замен часто оказываются несовместимыми с возможностью репликации ВИЧ-1. Устойчивые замены нуклеотидов в таких последовательностях появляются через продолжительное время.

Знание механизма приобретения устойчивости к действию sgРНК/Cas9 способно ускорить разработку стратегий, которые позволят преодолеть этот уникальный вирусный механизм. Одним из вариантов решения может быть программирование Cas9 с помощью множественных sgРНК, мишенями которых служат консервативные участки генома ВИЧ-1. Подобные комбинированные стратегии оказались успешными при АРТ и при миРНК-опосредованной генотерапии, которые обеспечивали устойчивое подавление репликации вируса [69]. Обнаружено, что воздействие на множественные мишени ДНК ВИЧ-1 с применением набора sgРНК приводит к существенно более сильному подавлению вирусной инфекции [13]. Другим подходом могло бы стать конструирование вариантов Cas9, которые были бы способны расщеплять ДНК вне последовательностей-мишеней. В этом случае NHEJ-индуцируемые мутации не предотвращали бы связывания Cas9/sgРНК и последующего расщепления провирусной ДНК, т. е. не приводили бы к развитию устойчивости. Такой подход представляется осуществимым в свете достижений в создании вариантов Cas9, которые способны распознавать различные PAM [70]. Кроме модификации Cas9, появление новых CRISPR и CRISPR-подобных ферментов также может способствовать преодолению устойчивости вируса. Например, белок Cpf1 действует подобно Cas9, но в отличие от Cas9, расщепляющей ДНК в участках, прилежащих к PAM, которые критичны для

распознавания sgРНК, SrfI расщепляет ДНК в участках, более удаленных от целевой последовательности и менее критичных для связывания sgРНК [71, 72]. Еще одним способом противодействия развитию устойчивости является подавление NHEJ-активности с помощью препаратов, которые воздействуют на ферменты репарации ДНК [73]. Совершенствование путей преодоления устойчивости ВИЧ-1 к CRISPR/Cas9 может также способствовать применению этой системы для подавления других вирусных инфекций.

Описанные выше проблемы не являются препятствиями альтернативному применению системы CRISPR/Cas9 для противодействия ВИЧ-инфекции, например, для инактивации гена *CCR5*, что делает клетки-мишени устойчивыми к ВИЧ-инфекции [51, 74]. Мутантные формы Cas9, которые не обладают нуклеазной активностью (dCas9), способны активировать латентный резервуар ВИЧ-1 за счет домена активатора транскрипции [75–77]. При взаимодействии sgРНК с промотором LTR ВИЧ-1 варианты dCas9 могли бы стимулировать экспрессию генов вируса и вывести его из латентного состояния.

Существуют и другие ограничения применения системы CRISPR/Cas9. Несмотря на то, что применение CRISPR/Cas9 приводило к эффективному удалению провирусной ДНК ВИЧ-1 из остро или латентно инфицированных клеток *in vitro* [11–13, 15], не исследована способность CRISPR/Cas9 удалять геном ВИЧ-1 из покоящихся CD4⁺-Т-клеток, выделенных от ВИЧ-инфицированных индивидуумов. Обнаружено, что подавление репликации ВИЧ-1, опосредованное sgРНК, менее выражено по сравнению с существующими терапевтическими стратегиями с применением малых молекулярных ингибиторов. Возможно, что CRISPR/Cas9 может применяться в соче-

тании с ВААПТ для удаления латентно инфицированных клеток, на которые ВААПТ сама по себе не действует. В отличие от антиретровирусных препаратов, технология CRISPR/Cas9 имеет потенциал длительной защиты против ВИЧ-1. Доставка CRISPR/Cas9-кодирующих генов *in vivo* может оказаться проблемой, хотя векторная система на основе лентивирусов эффективна в трансдукции в случае и CD4⁺-Т-клеток, и CD34⁺-гемопозитических стволовых клеток. Однако интегрирующийся в клетку лентивирусный вектор несет риск инсерционного онкогенеза. Возможный вариант решения этой проблемы – использование вирусоподобных частиц, содержащих Vpr-Cas9/sgРНК, для доставки этих комплексов в клетки-мишени [78]. Не ясно, могут ли быть преодолены ограничения использования системы CRISPR/Cas9 в результате перехода на системы с использованием TALEN или ZFN. Хотя обе эти системы более простые, так как не имеют РНК, их сложнее программировать в отношении точной специфичности к последовательностям-мишеням [3]. Важно отметить, что ZFN-опосредованное расщепление ДНК ВИЧ-1 также может привести к образованию устойчивых мутантных вариантов [78]. Однако информация, которая приобретена при исследовании редактирования вирусных или клеточных генов с помощью ZFN или TALEN, может облегчить применение CRISPR/Cas9 в сходных условиях. Понимание ограничений системы CRISPR/Cas9 будет только способствовать ее усовершенствованию и оптимизации, а в будущем – широкому использованию ее потенциала [19]. Быстрый прогресс в области применения CRISPR/Cas9 и обнаружение новых генетических инструментов дает уверенность в том, что эта система редактирования генома станет основой для разработки путей эффективного контроля вирусных инфекций.

■ Литература/References

1. Karpinski J.H.I., Chemnitz J., Schäfer C., Paszkowski-Rogacz M. et al. Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity. *Nat. Biotechnol.* 2016; 34: 401–9.
2. Schiffer J.T., Aubert M., Weber N.D., Mintzer E. et al. Targeted DNA mutagenesis for the cure of chronic viral infections. *J. Virol.* 2012; 86: 8920–36.
3. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013; 31 (7): 397–405.
4. Cai M., Yang Y. Targeted genome editing tools for disease modeling and gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 2014; 14 (1): 2–9.
5. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013; 339: 819–23.
6. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013; 339: 823–6.
7. Price A.A., Grakoui A., Weiss D.S. Harnessing the prokaryotic adaptive immune system as a eukaryotic antiviral defense. *Trends Microbiol.* 2016; 24: 294–306.
8. Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., Greene E.C. et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature.* 2014; 507 (7490): 62–7.
9. Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature.* 2014; 513 (7519): 569–73.
10. Doudna J.A., Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014; 346 (6213): 1258096.
11. Ebina H., Misawa N., Kanemura Y., Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sc. Rep.* 2013; 3: 2510–6.
12. Hu W., Kaminski R., Yang F., Zhang Y. et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111: 11 461–6.
13. Liao H.K., Gu Y., Diaz A., Marlett J. et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat. Commun.* 2015; 6: 6413.
14. Zhu W., Lei R., Le Duff Y., Li J. et al. The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology.* 2015; 12: 22.
15. Kaminski R., Chen Y., Fischer T., Tedaldi E. et al. Elimination of HIV-1 genomes from human T-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing. *Sci. Rep.* 2016; 6: 22555.
16. Yin C., Zhang T., Li F., Yang F. et al. Functional screening of guide RNAs targeting the regulatory and structural HIV-1 viral genome for a cure of AIDS. *AIDS.* 2016; 30: 1163–74.
17. Saayman S., Ali S.A. Morris K.V., Weinberg M.S. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015; 15 (6): 819–30.

18. Bhoj V.G., Thibodeaux S.R., Levine B.L. Novel gene and cellular therapy approaches for treating HIV. *Discov. Med.* 2016; 21 (116): 283–92.
19. Liang C., Wainberg M.A., Das A.T., Berkhout B. CRISPR/Cas9: a double-edged sword when used to combat HIV infection. *Retrovirology.* 2016; 13: 37.
20. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 2005; 60 (2): 174–82.
21. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology.* 2009; 155 (pt 3): 733–40.
22. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012; 337 (6096): 816–21.
23. Jinek M., East A., Cheng A., Lin S. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife.* 2013; 2: e00471.
24. Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z. et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* 2013; 154 (2): 442–51.
25. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* 2013; 152 (5): 1173–83.
26. Cheng A.W., Wang H., Yang H., Shi L. et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.* 2013; 23 (10): 1163–71.
27. Maeder M.L., Linder S.J., Cascio V.M., Fu Y. et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat. Methods.* 2013; 10 (10): 977–9.
28. Perez-Pinera P., Kocak D.D., Vockley C.M., Adler A.F. et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat. Methods.* 2013; 10 (10): 973–6.
29. Hu J., Lei Y., Wong W.K., Liu S. et al. Direct activation of human and mouse Oct4 genes using engineered TALE and Cas9 transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42 (7): 4375–90.
30. Qu X., Wang P., Ding D., Li L. et al. Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (16): 7771–82.
31. Sontheimer E.J., Barrangou R. The bacterial origins of the CRISPR genome-editing revolution. *Hum Gene Ther.* 2015; 26 (7): 413–24.
32. Mali P., Aach J., Stranges P.B., Esvelt K.M. et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol.* 2013; 31 (9): 833–8.
33. Tanenbaum M.E., Gilbert L.A., Qi L.S., Weissman J.S. et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell.* 2014; 159 (3): 635–46.
34. Кушниров В.В., Митькевич О.В., Ураков В.Н., Тер-Аванесян М.Д. Аптамеры и их использование в биологии и медицине. *Успехи соврем. естествознания.* 2013; 3: 40–3. [Kushnirov V.V., Mitkevich O.V., Urakov V.N., Ter-Avanesyan M.D. Aptamers and their use in biology and medicine. *Uspekhii sovremennogo estestvoznaniya.* 2013; (3): 40–3. (in Russian)]
35. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J. et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature.* 2015; 517 (7536): 583–8.
36. Gilbert L.A., Horlbeck M.A., Adamson B., Villalta J.E. et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell.* 2014; 159 (3): 647–61.
37. Cocchi F., DeVico A.L., Garzino-Demo A., Arya S.K. et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 1995; 270 (5243): 1811–5.
38. Nagasawa T., Hirota S., Tachibana K., Takakura N. et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996; 382 (6592): 635–8.
39. Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J. et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 1996; 382 (6593): 722–5.
40. Biti R., French R., Young J., Bennetts B. et al. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat. Med.* 1997; 3 (3): 252–3.
41. Hutter G., Nowak D., Mossner M., Ganepola S. et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2009; 360 (7): 692–8.
42. Allers K., Hutter G., Hofmann J., Loddenkemper C. et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation. *Blood.* 2011; 117 (10): 2791–9.
43. Hutter G., Thiel E. Allogeneic transplantation of CCR5-deficient progenitor cells in a patient with HIV infection: an update after 3 years and the search for patient No. 2. *AIDS.* 2011; 25 (2): 273–4.
44. Michael N.L., Chang G., Louie L.G., Mascola J.R. et al. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* 1997; 3 (3): 338–40.
45. Zimmerman P.A., Buckler-White A., Alkhatib G., Spalding T. et al. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol. Med.* 1997; 3 (1): 23–36.
46. Holt N., Wang J., Kim K., Friedman G. et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (8): 839–47.
47. Schleifman E.B., Bindra R., Leif J., del Campo J. et al. Targeted disruption of the CCR5 gene in human hematopoietic stem cells stimulated by peptide nucleic acids. *Chem. Biol.* 2011; 18 (9): 1189–98.
48. Perez E.E., Wang J., Miller J.C., Jouvenot Y. et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 2008; 26 (7): 808–16.
49. Tebas P., Stein D., Tang W.W., Frank I. et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370 (10): 901–10.
50. Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 2013; 31 (3): 230–2.
51. Ye L., Wang J., Beyer A.I., Teque F. et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Delta32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111 (26): 9591–6.
52. Wang W., Ye C., Liu J., Zhang D. et al. CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PLoS One.* 2014; 9 (12): e115987.
53. Cradick T.J., Fine E.J., Antico C.J., Bao G. CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (20): 9584–92.
54. Cho S.W., Kim S., Kim Y., Kweon J. et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 2014; 24 (1): 132–41.
55. Monroe K.M., Yang Z., Johnson J.R., Geng X. et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science.* 2014; 343 (6169): 428–32.
56. Truong L., Wood T., Henley J., Ya-Li L. et al. Autologous hematopoietic stem/progenitor cell (HSPC) therapy for monogenic blood disorders: scalable, cGMP-compliant process for generating highly efficient genome edited HSPC. *Blood.* 2013; 122 (21): 4213–3.
57. Mandal P.K., Ferreira L.M., Collins R., Meissner T.B. et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell.* 2014; 15 (5): 643–52.
58. Park R.J., Wang T., Koundakjian D., Hultquist J.F. et al. A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nat Genet.* 2017; 49: 193–203. doi: 10.1038/ng.3741.

59. Ludwig L.B., Ambrus J.L. Jr, Krawczyk K.A., Sharma S. et al. Human Immunodeficiency virus-type 1 LTR DNA contains an intrinsic gene producing antisense RNA and protein products. *Retrovirology*. 2006; 3: 80.
60. Landry S., Halin M., Lefort S., Audet B. et al. Detection, characterization and regulation of antisense transcripts in HIV-1. *Retrovirology*. 2007; 4: 71.
61. Kobayashi-Ishihara M., Yamagishi M., Hara T., Matsuda Y. et al. HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period. *Retrovirology*. 2012; 9 (1): 38.
62. Saayman S., Ackley A., Turner A.M., Famiglietti M. et al. An HIV-encoded antisense long noncoding RNA epigenetically regulates viral transcription. *Mol. Ther.* 2014; 22 (6): 1164–75.
63. Kirchhoff F., Greenough T.C., Brettler D.B., Sullivan J.L. et al. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 1995; 332 (4): 228–32.
64. Hariharan M., Scaria V., Pillai B., Brahmachari S. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 337: 1214–8.
65. Wang G., Zhao N., Berkhout B., Das A.T. CRISPR-Cas9 can inhibit HIV-1 replication but NHEJ repair facilitates virus escape. *Mol. Ther.* 2016; 24: 522.
66. Wang Z., Pan Q., Gendron P., Zhu W. et al. CRISPR/Cas9-derived mutations both inhibit HIV-1 replication and accelerate viral escape. *Cell Rep*. 2016; 15: 1–9.
67. Boden D., Pusch O., Lee F., Tucker L., Ramratnam B. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J. Virol.* 2003; 77: 11 531–5.
68. Das A.T., Brummelkamp T.R., Westerhout E.M., Vink M. et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J. Virol.* 2004; 78: 2601–5.
69. ter Brake O., Konstantinova P., Ceylan M., Berkhout B. Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. *Mol. Ther.* 2006; 14: 883–92.
70. Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T. et al. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat. Biotechnol.* 2016; 33: 1293–8.
71. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M. et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015; 163: 759–71.
72. Yamano T., Nishimasu H., Zetsche B., Hirano H. et al. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2016; 165: 949–62.
73. Vartak S.V., Raghavan S.C. Inhibition of nonhomologous end joining to increase the specificity of CRISPR/Cas9 genome editing. *FEBS J*. 2016; 282: 4289–94.
74. Hou P., Chen S., Wang S., Yu X. et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci. Rep.* 2015; 5: 15577.
75. Zhang Y., Yin C., Zhang T., Li F. et al. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci. Rep.* 2015; 5: 16277.
76. Saayman S.M., Lazar D.C., Scott T.A., Hart J.R. et al. Potent and targeted activation of latent HIV-1 using the CRISPR/dCas9 activator complex. *Mol. Ther.* 2016; 24: 488–98.
77. Limsirichai P., Gaj T., Schaffer D.V. CRISPR-mediated activation of latent HIV-1 expression. *Mol. Ther.* 2016; 24: 499–507.
78. Choi J.G., Dang Y., Abraham S., Ma H. et al. Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Ther.* 2016; 23 (7): 627–33.
79. De Silva Feelixge H.S., Stone D., Pietz H.L., Roychoudhury P. et al. Detection of treatment-resistant infectious HIV after genome-directed antiviral endonuclease therapy. *Antiviral. Res.* 2016; 126: 90–8.

© Коллектив авторов, 2019

Авдеева Ж.И., Солдатов А.А., Медуницын Н.В., Мосягин В.Д., Бондарев В.П., Меркулов В.А.

Критерии определения подобия препаратов моноклональных антител, предназначенных для лечения орфанных заболеваний

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, Москва, Россия

В обзоре приведена информация, касающаяся вопросов определения биоподобия лекарственных препаратов моноклональных антител, предназначенных для лечения редких (орфанных) заболеваний с учетом регуляторных требований, относящихся к орфанным лекарственным препаратам. Приведены общие принципы доказательства сходства/подобия биотехнологических лекарственных препаратов, особенности регуляторных требований к препаратам на основе интактных моноклональных антител, модифицированных антител, конъюгатов, фрагментов иммуноглобулина, белков слияния (fusion proteins) и др.

Приведены сведения об особенностях критериев, лежащих в основе определения двух лекарственных препаратов моноклональных антител, как биоподобных, в случае использования их для лечения орфанных заболеваний, на основе информации, приведенной в нормативных документах.

Ключевые слова: орфанные препараты; моноклональные антитела; biosimilars; биоаналогичные (биоподобные) препараты; доказательство подобия; модифицированные моноклональные антитела

Статья поступила 16.07.2018. Принята в печать 16.08.2018.

Для цитирования: Авдеева Ж.И., Солдатов А.А., Медуницын Н.В., Мосягин В.Д., Бондарев В.П., Меркулов В.А. Критерии определения подобия препаратов моноклональных антител, предназначенных для лечения орфанных заболеваний. Иммунология. 2019; 40 (1): 52–61. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11006.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Avdeeva Zh.I., Soldatov A.A., Medunitsyn N.V., Mosjagin V.D., Bondarev V.P., Merkulov V.A.

Criteria of determination of similarity of monoclonal antibodies intended for treatment of orphan diseases

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 127051, Moscow, Russia

In the review the information, concerning questions of interpreting sameness of medical monoclonal antibody products, intended for treatment rare (orphan) of diseases with the account regulatory requirements, concerning to orphan drugs is resulted. The general principles of the proof of similarity of biotechnological medical products, features regulatory requirements to preparations on a basis unmodified monoclonal antibody products, the modified antibodies, antibody conjugates, fragments of an antibody, fusion proteins etc. The data on the features of the criteria underlying definition of two monoclonal antibody drugs, as biosimilar, in the case of their use for the treatment of orphan diseases, based on the information provided in the regulatory documents.

Keywords: orphan drugs; monoclonal antibodies; biosimilars; similarity proof; modified monoclonal antibody

Received 16.07.2018. Accepted 16.08.2018.

For citation: Avdeeva Zh.I., Soldatov A.A., Medunitsyn N.V., Mosjagin V.D., Bondarev V.P., Merkulov V.A. Criteria of determination of similarity of monoclonal antibodies intended for treatment of orphan diseases. Immunologiya. 2019; 40 (1): 52–61. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11006. (in Russian)

Acknowledgments. The work was performed under state assignment, research ntsemp Ministry of health of Russia No. 056-00154-19-00 to conduct applied scientific research (the number of state accounting research АААА-А18-118021590046-9).

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

Для корреспонденции
Авдеева Жанна Ильдаровна –
доктор медицинских наук,
профессор, главный эксперт
ФГБУ «Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»
Минздрава России, Москва, Россия
E-mail: avd-cytok@yandex.ru

For correspondence
Avdeeva Zhanna I. –
MD, Professor, Chief Expert,
Scientific Centre for Expert
Evaluation of Medicinal Products,
Moscow, Russia
E-mail: avd-cytok@yandex.ru

Орфанные, или «сиротские», заболевания представляют собой группу редких болезней, при этом орфанными называют не просто малораспространенные, но заболевания, которые характеризуют как хронические тяжелые или угрожающие жизни болезни и которые могут приводить к инвалидности, сокращению продолжительности жизни пациентов. В настоящее время описано около 7000 разновидностей таких заболеваний. Распространенность орфанных заболеваний составляет около 1 случая на 2000 населения и реже, однако данная статистика условна, так как одно и то же заболевание может быть редким в одном регионе и частым в другом. Например, проказа часто встречается в Индии, но редко в Европе. В США к перечню орфанных заболеваний относят болезни, которыми страдают менее 100 тыс. больных (т. е. распространенность 7,5 случаев на 10 тыс. населения); в странах Европейского Союза (ЕС) – 215 тыс. (5 на 10 тыс.); в Японии – менее 50 тысяч (4 на 10 тыс.); в Австралии – менее 2 тыс. (1,1 на 10 тыс.); в Великобритании – 1 тыс. больных «ультрасиротскими» заболеваниями (0,18 случаев на 10 тыс.) (см. таблицу) [1].

Впервые в мире в 1983 г. в США был принят закон, регламентирующий статус редких, «сиротских» орфанных заболеваний и лекарственных препаратов, которые применяются для их лечения (Orphan Drug Act (ODA) 21 CFR Part 316). Агентство FDA (Food and Drug Administration) опубликовало разработанные правила реализации закона о таких препаратах от 29 января 1991 г. [2], окончательный вариант правил представлен 29 декабря 1992 г. [3]. В целях уточнения нормативных положений и решения проблем, которые возникли по данному вопросу, начиная с 1992 г., в 2013 г. внесены определенные поправки к части 316 указанных правил [4]. Основная цель данного закона – стимулирование разработки и производства орфанных препаратов для лечения редких заболеваний.

Согласно закону, принятому в США в 1983 г., впервые введено определение редких (орфанных) заболеваний, около 1600 известных к тому времени заболеваний (наследственных и ненаследственных) были признаны редкими, а около 300 лекарств отнесены к препаратам «сиротам», или орфанным препаратам. Аналогичные законодательные акты приняты и в Сингапуре (1991), Японии (1993), Южной Корее, Канаде и странах ЕС (1995), Австралии (1997), а также в ряде других стран.

В российском законодательстве впервые определение орфанным заболеваниям дано в 2011 г. в Федеральном законе «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»¹, в котором указано, что к ним относятся заболевания, имеющие распространенность не более 10 случаев на 100 тыс. населения. Перечень редких (орфанных) заболеваний формируется Минздравом России на основании статистических данных и размещается на его официальном сайте в сети Интер-

нет. Постановлением Правительства РФ от 26.04.2012 № 403 (ред. от 04.09.2012)² обозначен перечень редких болезней, включающий 24 наименования, такие как гемолитико-уремический синдром, нарушение обмена меди (болезнь Вильсона), мукополисахаридоз типа I, типа II и типа III, дефект в системе комплемента, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (Маркиафавы–Микели), апластическая анемия неуточненная и др.

Сведения о характеристике, распространенности орфанных заболеваний и законодательных актах, касающихся указанных заболеваний и орфанных препаратов, отражены в ряде опубликованных обзоров отечественных авторов [5–10].

Редкие болезни условно можно подразделить на 2 группы: наследственные и ненаследственные. Более 80% редких заболеваний имеют наследственную природу, такие заболевания могут не только передаваться от родителей, но и возникать вследствие новых мутаций генов, что может провоцировать развитие заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ, функционирования центральной нервной системы, органов дыхания и т.д. Симптомы редких заболеваний не всегда проявляются сразу после рождения ребенка, они могут развиваться через несколько месяцев и даже лет, особенно в случае болезней накопления, таких как мукополисахаридоз, болезнь Гоше, болезнь Фабри и др. Как правило, для лечения орфанных заболеваний требуются дорогостоящие препараты, которые характеризуются направленным действием на патогенетически значимые механизмы, задействованные в развитии заболевания.

Особенности разработки орфанных препаратов

Известно, что орфанные заболевания могут приводить к инвалидизации и смертности как в раннем детстве, так и в более позднем возрасте. Именно поэтому особое значение придается внедрению современных методов диагностики и разработке новых эффективных методов терапии редких болезней. Однако диагностика, лечение и профилактика редких заболеваний являются сложной проблемой практического здравоохранения.

В соответствии с п. 6.1 ст. 4 Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», «орфанные лекарственные препараты – лекарственные препараты, предназначенные исключительно для диагностики или патогенетического лечения (лечения, направленного на механизм развития заболевания) редких (орфанных) заболеваний».

Разработка патогенетически направленных препаратов очень сложна, поскольку патогенез развития заболевания может быть очень сложным, а подчас он до конца не установлен. В связи с этим разработка орфанных лекарственных препаратов требует больших мате-

¹ Федеральный Закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Ст. 44, ч. 1.

² Постановление Правительства России от 26.04.2012 № 403 (ред. от 04.09.2012) «О порядке ведения Федерального регистра лиц, страдающих жизнеугрожающими и хроническими прогрессирующими редкими (орфанными) заболеваниями, приводящими к сокращению продолжительности жизни граждан или их инвалидности, и его регионального сегмента». Первоначальный текст документа опубликован в издании «Собрание законодательства Российской Федерации» от 07.05.2012 № 19. Ст. 2428.

риальных затрат. Однако следует учитывать, что только патогенетическая терапия позволяет остановить прогрессирование заболевания, способствует обратному развитию симптомов болезни и значительно улучшает качество жизни больных.

Сложности при разработке препарата также могут быть связаны с подбором контингента при проведении клинических исследований ввиду малой распространенности орфанных заболеваний. При этом необходимо отметить, что популяция таких пациентов будет очень неоднородной (по возрасту, полу, сопутствующим заболеваниям и другим признакам) по сравнению с носителями других, более массовых заболеваний. Все вышеуказанные факторы затрудняют производство подходящего для большей части популяции пациентов лекарственного препарата, а также его последующую реализацию. Учитывая малое число профильных пациентов, объем продаж будет очень небольшим, что приведет к существенному увеличению стоимости лекарственного препарата. В конечном итоге производство орфанного препарата станет убыточным.

Для преодоления данных проблем требуется государственная или спонсорская финансовая поддержка разработчиков и производителей препарата для стимулирования исследований по изучению патогенеза орфанных заболеваний и разработке препаратов для их диагностики и лечения.

В США предусмотрены налоговые льготы производителям орфанных препаратов. В развитых странах (Франция, Великобритания, Канада, Австралия, Япония и некоторых других) также предусмотрена программа финансирования лечения орфанных заболеваний, поскольку самостоятельно оплачивать многомиллионные закупки препарата абсолютное большинство пациентов не в состоянии. Финансирование лечения орфанных заболеваний является высокочрезвычайно затратной статьёй в государственном бюджете.

В России в настоящее время действует программа «7 нозологий», по которой выделяются средства на приобретение лекарств для пациентов, страдающих одним из 7 заболеваний, требующих дорогостоящего лечения; 4 из них относятся к числу редких болезней: гемофилия, муковисцидоз, гипопизарный нанизм и болезнь Гоше.

В США стимулом для разработки лекарственных препаратов, предназначенных для лечения редких заболеваний, служит положение, приведенное в законах об орфанных препаратах, касающееся периода исключительного одобрения. Согласно данному указанию регуляторными органами во время установленного периода не регистрируется никакой другой препарат, предназначенный для применения по тем же показаниям, что и ранее зарегистрированный орфанный препарат. Период исключительного одобрения признан не только в США, но и в других странах мира, он определяется сроком до 10 лет (в Японии – 5 лет, США – 7 лет, странах ЕС – 10 лет). Признание периода исключительного одобрения является более значимым положением, чем положение о патентной защите препарата.

В США в составе FDA существует подразделение Office of Orphan Products Development (OOPD), функции которого предусматривают утверждение орфанных препаратов. В соответствии с законодательством США разработанный препарат после окончания периода исключительного одобрения может быть зарегистрирован как оригинальный, предназначенный для лечения того же редкого заболевания, только в том случае, если заявитель продемонстрирует его большую клиническую эффективность или докажет, что он вызывает меньше побочных эффектов, чем зарегистрированный орфанный препарат. В противном случае вновь разработанный препарат должен рассматриваться как биоподобный ранее утвержденному орфанному препарату, если он будет соответствовать требованиям, предъявляемым к биоподобным лекарственным препаратам [11, 12].

Благодаря современным достижениям науки количество новых орфанных лекарственных препаратов направленного действия постоянно увеличивается, а также совершенствуются схемы лечения больных, страдающих редкими заболеваниями. Разработка генно-инженерных методов, в частности технологии рекомбинантных ДНК, позволяет получать молекулы белка с заданными свойствами, на основе которых разрабатываются современные биотехнологические лекарственные препараты, которые применяются для лечения тяжело протекающих заболеваний. Широкое и успешное использование биотехнологических лекарственных препаратов на основе моноклональных антител (МкАТ) стимулирует фармпроизводителей разрабатывать препараты МкАТ, в том числе биоподобных, для лечения и орфанных заболеваний.

Следует отметить, что принципы доказательства подобия биотехнологических лекарственных препаратов, в частности препаратов на основе МкАТ, предназначенных для лечения редких заболеваний, отличаются от принципов установления подобия для данной группы препаратов, применяемых для лечения других заболеваний.

Общие принципы доказательства подобия неоригинальных биотехнологических лекарственных препаратов

Окончание срока патентной защиты на оригинальный биотехнологический препарат позволяет разрабатывать/воспроизводить новые версии действующего вещества и регистрировать на его основе лекарственный препарат как биоподобный ранее утвержденному оригинальному препарату.

Разработка нормативных требований для оценки качества, доклинического и клинического изучения биоподобных препаратов (biosimilars) проводится Европейским медицинским агентством (European Medicines Agency – ЕМА) с начала 2000-х гг. В разработанных документах отражены общие принципы доказательства сходства/подобия нового и оригинального (рефе-

рентного) препаратов [13–16]. Аналогичные вопросы нашли отражение в документах ВОЗ [17, 18], FDA [19, 20], в отечественных руководствах [21, 22]. Согласно определению ЕМА, «биоподобным препаратом является биологический лекарственный препарат, который содержит новую версию действующего вещества зарегистрированного оригинального (референтного) препарата, и продемонстрировано сходство/подобие биоподобного и референтного препаратов по показателям качества, биологической активности, эффективности и безопасности». По определению FDA данная группа препаратов «имеет высокую степень сходства по показателям качества, безопасности и эффективности с препаратом сравнения (оригинальным, референтным), а выявленные незначительные различия не имеют клинической значимости».

Согласно международным требованиям, все этапы разработки биоподобного препарата основаны на демонстрации сходства/биоподобия (biosimilarity) с оригинальным (референтным) препаратом путем проведения прямых сравнительных исследований с целью доказательства высокого сходства их показателей качества, эффективности, безопасности и иммуногенности.

Первым этапом доказательства подобия является сравнительная оценка качества препаратов с использованием широкого спектра аналитических методик, характеризующихся достаточно высокой чувствительностью, что позволяет выявить потенциальные различия между препаратами. Демонстрация высокой степени сходства препаратов на этапе оценки качества дает возможность сократить объем исследований на последующих этапах, при сравнительном доклиническом и клиническом исследовании.

Учитывая особенности и сложности создания орфанных препаратов, FDA разрабатываются требования, регламентирующие условия доказательства подобия вновь разработанного орфанного препарата с ранее утвержденным препаратом. Общим положением является то, что для биоподобных препаратов на основе макромолекул, предназначенных для лечения редких заболеваний, как и для биоподобных препаратов для лечения заболеваний, не относящихся к категории редких/орфанных, не могут быть применимы требования, предъявляемые при доказательстве сходства/подобия препаратов, получаемых путем химического синтеза, которые рассматриваются как воспроизведенные препараты (дженерики).

В связи с этим при установлении критериев доказательства подобия орфанных препаратов, т. е. критериев, на основании которых решается вопрос о том, можно ли рассматривать 2 биотехнологических препарата как подобные, прежде всего следует учитывать, что критерии для препаратов на основе макромолекул отличаются от критериев для препаратов на основе малых молекул [11, 12].

Препараты на основе макромолекул включают белки, нуклеиновые кислоты, углеводы или их комплексы. Первым этапом доказательства подобия вновь разработанного

препарата, заявляемого в качестве биоподобного, и оригинального (референтного) препарата является сравнительная оценка качества, включающая изучение структурных, физико-химических характеристик и биологических свойств. Согласно документам FDA, макромолекулярный препарат является биоподобным с другим, ранее утвержденным препаратом, если он «имеет сходные принципиально важные молекулярные структурные характеристики (но не обязательно все структурные особенности) и предназначен для применения по тем же показаниям, что и ранее утвержденный препарат...» [11].

В документах FDA приведено разъяснение, что 2 белковых препарата могут рассматриваться как подобные, «если различия в структуре между ними обусловлены только посттрансляционными модификациями, ошибкой трансляции или транскрипции или выявлены лишь минимальные различия в аминокислотной последовательности...» [11]. Указанные характеристики являются уникальными и касаются только молекул антител, их сравнительная оценка лежит в основе установления сходства/подобия препаратов МкАТ. Учитывая, что это орфанные препараты, в документах FDA приведены дополнительные рекомендации о том, в каком случае 2 препарата МкАТ можно рассматривать как подобные.

Результаты последних научных исследований свидетельствуют, что внимание производителей также будет направлено на разработку лекарственных препаратов на основе растворимых Т-клеточных рецепторов, предназначенных для терапевтического применения. Положения, лежащие в основе интерпретации результатов доказательства подобия/сходства препаратов МкАТ, должны быть применимы и к лекарственным препаратам на основе растворимых Т-клеточных рецепторов.

Структурные особенности антител и Т-клеточных рецепторов

Известно, что *молекула антитела* состоит из 4 полипептидных цепей: двух идентичных тяжелых (H) и двух идентичных легких (L) цепей. В обеих тяжелых и легких цепях выделяют вариабельные (V) и константные (C) домены. Участки, образующиеся за счет комбинирования V-доменов H- и L-цепей (VH–VL), формируют структуру, ответственную за специфическое связывание антигена. При этом константная область тяжелой цепи не связана с распознаванием антигена, она ответственна за эффекторные функции, такие как фиксация комплемента и зависимость от антител клеточная цитотоксичность (рис. 1).

N-концевые аминокислотные участки тяжелой и легкой цепей индивидуальных молекул иммуноглобулина (вариабельные домены) имеют разные последовательности, тогда как аминокислотная последовательность C-региона (константные или C-домены) постоянна в пределах одного изотипа (класс или подкласс) иммуноглобулина.

При анализе аминокислотных последовательностей вариабельного домена были определены 3 гипервариабельных участка с высокой вариабельностью между

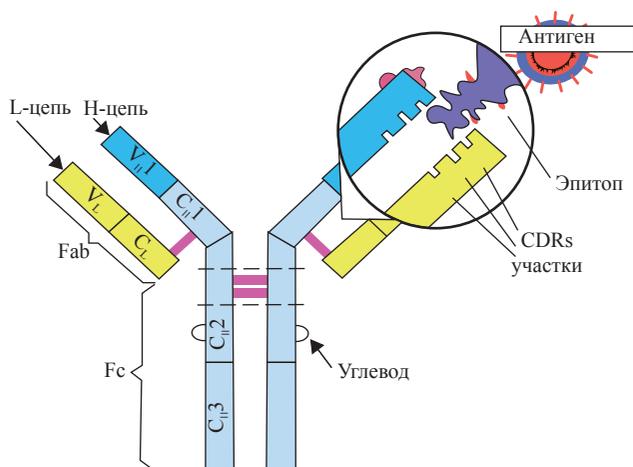


Рис. 1. Схема строения молекулы иммуноглобулина класса G (IgG)

индивидуальными молекулами. Эти участки играют ключевую роль в распознавании и связывании антигена, они известны как участки, определяющие комплементарность связывания антигена (CDR1, CDR2 и CDR3) [23]. Также в вариабельном домене выделяют 4 участка с относительно постоянным составом, которые определяют как каркасные/рамочные участки (FR1, FR2, FR3 и FR4).

Согласно системе Kabat положение CDRs 1, 2, и 3 участков соответствует расположению 24–34, 50–56 и 89–97 аминокислотных остатков в легких цепях и расположению 31–35, 50–65 и 95–102 аминокислотных остатков в тяжелых цепях, соответственно трем указанным участкам [24]. По определению Информационной системы международной иммуногенетики (IMGT), положение CDRs 1, 2 и 3 участков в тяжелой и легкой цепях соответствует расположению 27–38, 56–65 и 105–117 аминокислотных остатков, соответственно [25]. Хотя позиции этих аминокислотных остатков определяют границы каждого CDRs-связывающего участка, длины CDRs-участков могут варьировать [24, 25].

Гипервариабельные участки VH- и VL-регионов, т. е. CDRs-участки H- и L-цепей, расположенные в зоне изгибов полипептидных цепей, повернуты навстречу друг другу и формируют гидрофильный канал, соответствующий антиген-связывающему участку (активному

центру) антител, т. е. сайту связывания антигена в молекуле иммуноглобулина. Результаты электронной микроскопии свидетельствуют о том, что гидрофильный канал представляет собой полость длиной 6 нм и шириной 1,2–1,5 нм [23, 26].

CDRs-участки создают антиген-связывающий карман/канал за счет взаимодействия между тяжелой и легкой цепями вариабельных регионов, в то время как каркасные/рамочные участки формируют структуру, на которой располагается антиген-связывающий карман/канал, т. е. рамочный регион обеспечивает необходимую конформацию CDRs-участков.

Детально структурное строение активных центров антител и их специфическое взаимодействие с антигеном изучены с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллов молекул иммуноглобулинов. Установлено, что гипервариабельные участки V-доменов входят в состав активного центра не полностью, поверхность антигенсвязывающего участка захватывает только около 30% CDRs [26]. Сверхвысокая вариабельность CDRs и активных центров обеспечивает уникальность молекул иммуноглобулинов, синтезируемых В-лимфоцитами одного клона, не только по структуре, но и по способности связывать различные антигены.

Сложность анализа физико-химических характеристик и специфической активности препаратов на основе МкАТ обусловлена их молекулярной структурой, зависимостью проявлений биологической активности как от структуры антиген-связывающего сайта, посттрансляционных изменений, профиля гликозилирования, наличия и состава изоформ, так и от конформационной структуры белка.

Проявления биологической активности препаратов МкАТ опосредованы специфическим взаимодействием F(ab)₂-фрагмента МкАТ с соответствующим лигандом, а также связыванием с Fc-рецепторами на клетках, участвующих в реализации иммунных реакций, таких как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ) и апоптоз.

Чрезвычайно широкая вариабельность специфичности, характеризующая иммуноглобулины, гарантирует защиту организма от самого неожиданного антигенного материала, с которым возможен контакт. Для обеспечения такой вариабельности иммуноглобулинов задействованы разнообразные механизмы. Специфичность антител зависит от взаимодействия вариабельных доменов легких и тяжелых цепей, формирующих CDRs-участки. Генетический контроль структуры иммуноглобулинов осуществляется большим набором V-генов и незначительным числом дополнительных D- и J-мини-генов. Случайная комбинация одного из V-генов с одним из J- и D- генных сегментов (мини-генов) лежит в основе вариабельности антител, меняющейся от белка к белку. Количество V-генов, D- и J- мини-генов для тяжелых и легких цепей таково, что в условиях случайной рекомбинации возможно потенциальное образование до $1,6 \cdot 10^7$ отличающихся антител [27].

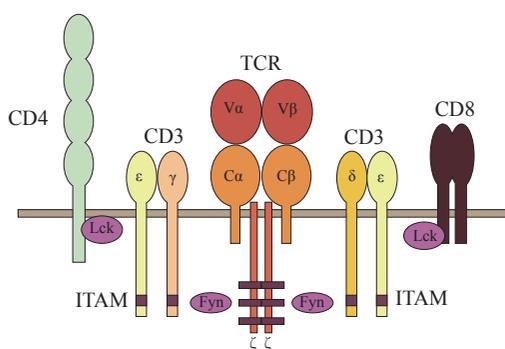


Рис. 2. Схема Т-клеточного рецептора и связанных с ним молекул [26]

В действительности разнообразие антител значительно выше. Свой вклад в разнообразие иммуноглобулинов вносят явления, сопутствующие рекомбинации: случайный захват пограничных, не включенных в стандартный генный сегмент нуклеотидов; некомплементарные вставки (достройки) при сшивке одного генного сегмента с другим; участие псевдогенов как поставщиков нуклеотидов в основной функционирующий V-ген, затрагивающий V-, но не C-ген; нарушение рамки считывания у D-сегментов; соматический мутагенез. В связи с наличием указанных факторов возможно формирование свыше $1 \cdot 10^{10}$ различных антител [28].

Механизмы генерации разнообразия антител одинаковы для всех антител, независимо от процесса: продуцируются иммортализованными клетками как МкАТ или синтезируются в организме при антигенной стимуляции в виде поликлональных антител. Все молекулы иммуноглобулинов, продуцируемые одной конкретной В-клеткой, построены из идентичных H- и L-цепей, имеют один и тот же изотип и аллотип, а также обладают одинаковой специфичностью к антигену. Только клетки, относящиеся к одному клону, т. е. происходящие от одного предшественника, продуцируют идентичные иммуноглобулины, если в их V-генах не появилась мутация.

МкАТ – действующее вещество рассматриваемых лекарственных препаратов, является продуктом одного клона клеток, однако, учитывая вышесказанное о множестве различных процессов, участвующих в формировании разнообразных антител, маловероятно, что независимо полученные МкАТ с одинаковой антигенной специфичностью будут иметь идентичные аминокислотные последовательности.

Клеточный рецептор, экспрессируемый на мембране Т-лимфоцитов (TCR), как и иммуноглобулины, относится к антиген-распознающим молекулам. Различают 2 типа рецепторов: $\alpha\beta$ TCR и $\gamma\delta$ TCR, в состав которых соответственно входят по 2 полипептидные цепи (α и β) и (γ и δ). TCR является структурой, связанной с мембраной в своей нативной функциональной форме, растворимые молекулы TCR не образуются.

Димеры $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ являются антиген-распознающей частью TCR. Цепи TCR сходны по своей структуре с L-цепями иммуноглобулинов. Каждая цепь TCR имеет 2 внеклеточных домена – варибельный (V) и константный (C). В V-доменах TCR, как и в V-доменах иммуноглобулинов выделяют 3 CDRs-участка, имеющих гиперварибельную последовательность аминокислот, определяющих специфичность связывания с антигеном, и 4 каркасных участка, характеризующихся относительным постоянством аминокислотной последовательности (рис. 2).

В отличие от антител, распознающих эпитопы свободных антигенов, $\alpha\beta$ TCR распознает пептидные фрагменты антигенов в комплексе с молекулой главного комплекса гистосовместимости (ГКГ). Каждый Т-лимфоцит может экспрессировать только один тип TCR – $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$. При этом более 95% зрелых Т-клеток, которые циркулируют

в крови и лимфе, а также локализируются во вторичных лимфоидных органах, несут $\alpha\beta$ -тип рецептора. Субпопуляция Т-клеток, экспрессирующих $\gamma\delta$ -тип рецептора, составляет 1–3%, эти клетки в основном локализируются в слизистой оболочке кишечника. В состав клеточного рецептора входит также комплекс полипептидных цепей, определяемых как CD3, и димер ζ -цепей, определяемый как CD274. Во внутриклеточной части γ -, δ - и ϵ -цепей содержится мотив ITAM, к указанным цепям примыкает тирозинкиназа Fyn. Все полипептидные цепи, формирующие CD3 и CD274, а также примыкающая к ним тирозинкиназа Fyn, участвуют во внутриклеточной передаче сигналов при активации Т-клетки за счет специфического взаимодействия TCR с соответствующим антигеном. Указанный комплекс выполняет сигнальную функцию.

Т-клеточный рецептор характеризуется аналогичной широкой варибельностью, которая также генерируется за счет нескольких специфических зародышевых генов Т-клеточного рецептора и за счет соматического мутагенеза, подобных тем, которые описаны для антител.

Принципы установления подобия/сходства препаратов моноклональных антитела

В документе, разработанном FDA [11], изложены рекомендации, касающиеся препаратов МкАТ, которые представлены интактными антителами, фрагментами антител, конъюгатами, препаратами на основе слитных белков (белки слияния – fusion proteins). Также к данной группе препаратов относятся би- и мультиспецифические антитела, препараты на основе фрагментов иммуноглобулинов, которые содержат пару варибельных доменов легкой и тяжелой цепи (V_H – V_L), единичный V-домен или комбинацию единичных V-доменов, в которых CDRs-участки формируют антиген-связывающий участок.

Важно подчеркнуть, что положения, изложенные в указанном документе, относятся только к перечисленным группам интактных и модифицированных препаратов МкАТ и не относятся к препаратам на основе фрагментов антител или слитым белкам, которые содержат соответствующий пептид и только константный домен иммуноглобулина и не содержат антиген-связывающий участок иммуноглобулина.

Подобие/сходство препаратов немодифицированных МкАТ

Определение подобия/сходства макромолекул в соответствии с положениями Закона об орфанных препаратах и его подзаконных актов основывается на изучении молекулярной структуры препаратов [11]. При определении подобия/сходства немодифицированных МкАТ в соответствии с указанными документами заключение должно базироваться на результатах оценки CDRs участков тяжелой и легкой цепей варибельных

регионов, которые выявляют главные функциональные особенности молекулярной структуры препаратов МкАТ. Последовательности аминокислот CDRs-участков определяют в соответствии с системами Kabat или IMGT, как указано выше [24, 25].

По мнению FDA, в соответствии с нормативными положениями данных документов, 2 препарата МкАТ могут быть рассмотрены как подобные/сходные, если аминокислотные последовательности CDRs-участков не отличаются или если между ними выявляются минимальные различия в аминокислотных остатках. Другие потенциально важные отличия аминокислот, определяемые вне CDRs-участков, такие как различия в профиле гликозилирования или различия, связанные с посттрансляционными модификациями, не обязательно указывают на то, что данные препараты должны рассматриваться как разные.

FDA при наличии таких различий в структуре молекул МкАТ рекомендует делать заключение индивидуально в зависимости от конкретного случая. Информация, которая важна для принятия решения о биоподобии, включает оценку аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей переменных доменов препаратов антител, любых изменений в аминокислотных последовательностях других регионов антител и любых изменений в структуре антигенной детерминанты или участка, расположенном вблизи активного сайта, имеющих значение для связывания антигена, которые были внесены разработчиком препарата.

Критерии определения подобия/сходства конъюгированных антител, препаратов на основе белков слияния/fusion proteins, биспецифических и мультиспецифических антител

Препараты МкАТ могут быть в виде конъюгатов, в которых антитела конъюгированы химическими методами с радионуклидами, лекарственными препаратами, макромолекулами или другими агентами, а также они могут быть представлены в виде белков слияния/fusion proteins. Препараты МкАТ в виде белка слияния содержат оба участка переменной цепи V_H-V_L , где одна из этих цепей (обычно V_H или C_H) и другой белок синтезируются как единая аминокислотная цепь. Эти типы препаратов отличаются от немодифицированных МкАТ тем, что у них, как правило, есть важные дополнительные функциональные свойства. Указанные препараты чаще всего имеют меньшую молекулярную массу и поэтому приобретают дополнительные свойства, присущие низкомолекулярным лекарственным препаратам. Кроме того, проявления активности препарата будут обусловлены также особенностью молекулярной структуры, связанной с конъюгированной или слитной макромолекулой.

Согласно положениям, изложенным в рассматриваемом документе FDA, для таких препаратов предполагается установить следующие регуляторные требования. Определение подобия/сходства указанных препаратов

на основе белков слияния будет основано на определении подобия/сходства фрагментов МкАТ и подобия/сходства другого функционально активного элемента конъюгированной молекулы [11].

Выявление различия в любом из этих элементов дает основание сделать заключение о том, что молекулы действующего вещества двух сравниваемых препаратов различны. В то же время 2 препарата конъюгированных МкАТ или 2 препарата на основе белков слияния могут рассматриваться как подобные/сходные препараты, если последовательности аминокислотных остатков CDRs-участков антитела и функционального элемента конъюгированной молекулы являются подобными.

В настоящее время современные достижения биотехнологии позволяют получать препараты МкАТ, характеризующиеся двойной или множественной специфичностью. Имеются производственные платформы, на основе которых базируется производство би- и мультиспецифических МкАТ.

В принципе, биспецифические антитела генерируются путем объединения тяжелой и легкой цепей от МкАТ одной специфичности с парой тяжелой-легкой цепи от МкАТ другой специфичности, в связи с чем биспецифические антитела имеют в своей структуре 2 различных CDRs-участка. Кроме того, биспецифические антитела могут быть составлены из двух отдельных V-доменов от МкАТ, характеризующихся различной специфичностью. Мультиспецифические антитела обычно содержат несколько единичных V-доменов от различных МкАТ или несколько V_H-V_L пар, причем каждая из них имеет уникальную специфичность.

Согласно устанавливаемым критериям, 2 препарата би- или мультиспецифических антител могут рассматриваться как подобные препараты, если все CDRs-участки всех V-доменов, включенных в структуру антител, являются подобными или имеются лишь минимальные различия в аминокислотных последовательностях этих участков.

Изменения в структуре антител, которые не всегда указывают на различия между двумя препаратами МкАТ, имеющими подобные CDRs-регионы

В ряде случаев для оптимизации проявлений функциональных свойств препаратов на основе МкАТ разработчиком могут быть внесены изменения в структурные характеристики МкАТ. При этом следует отметить, что рассматриваются препараты, в которых изменения внесены в структуры регионов молекулы IgG, не относящиеся к CDRs-участкам. По мнению FDA, при определении подобия/сходства двух таких препаратов МкАТ, предназначенных для лечения орфанных заболеваний, характеризующихся подобными CDRs-участками, различия в структуре не всегда свидетельствуют о том, что 2 препарата являются различными лекарственными препаратами, в соответствии с Законом об орфанных препаратах и его подзаконных актов.

Достижения в области клонирования генов и генно-инженерных технологий открывают новые перспективы в разработке более эффективных и модифицированных препаратов МкАТ.

Ниже приведена информация о том, при каких изменениях в структуре молекул двух препаратов МкАТ, характеризующихся подобными CDRs участками и предназначенных для лечения орфанных заболеваний, при определении их подобия/сходства не рассматриваются FDA как различные лекарственные препараты в соответствии с Законом об орфанных препаратах и его подзаконных актов.

Рамочный/каркасный регион

Возможны изменения каркасного региона молекулы IgG – участка варибельной части молекулы, характеризующейся меньшей изменчивостью по сравнению с гиперварибельными участками.

Изменения каркасного региона могут быть связаны с гуманизацией МкАТ нечеловеческого происхождения, созданием или модификацией препаратов гуманизированных МкАТ, характеризующихся минимальным наличием аминокислотных последовательностей грызунов (мыши или крысы), присутствующих только CDRs-регионах. Возможны также другие инженерные преобразования определенных аминокислотных остатков каркасного региона, которые важны для контакта с антигеном или стабилизации активного сайта связывания антигена.

Константный регион (константные домены цепей иммуноглобулина)

Различия константных регионов иммуноглобулина препаратов МкАТ могут быть обусловлены следующими факторами:

- принадлежностью иммуноглобулина к определенному классу или подклассу IgG, константные области которых различаются;
- изменениями определенных аминокислотных остатков, внесенными разработчиком препарата с целью изменения эффекторных функций иммуноглобулина, обусловленных связыванием с Fc-рецептором;
- видовым происхождением константной области иммуноглобулина МкАТ, что заложено в характеристику препарата на этапе его разработки.

■ Литература

1. McGabe C., Claxton K., Tsuchiya A. Orphan drugs and the NHS: should we value rarity? *BMJ*. 2005; 331: 1016–9.
2. FDA, Orphan Drug Regulations Proposed Rule, 56 FR 3338 (Jan. 29, 1991).
3. FDA, Orphan Drug Regulations Final Rule, 57 FR 62076 (Dec. 12, 1992).
4. FDA, Orphan Drug Regulations Final Rule, 78 FR 35117 (June 12, 2013).
5. Новиков П.В. Проблема редких (орфанных) заболеваний в Российской Федерации: медицинские и нормативно-правовые аспекты ее решения // *Тер. арх.* 2014. Т. 86, № 12. С. 3–12.

Фрагменты антител

Препараты интактных МкАТ и препараты на основе фрагментов антител, имеющие подобные последовательности CDR-участка или лишь незначительные различия аминокислотных последовательностей, не рассматриваются как различные препараты. Данное положение имеет отношение и к препаратам на основе пептидов и целых белковых молекул иммуноглобулина при их рассмотрении в качестве подобных, предназначенных для лечения редких заболеваний. В документе агентства указано, что «...согласно требованиям FDA, для того чтобы пептид, который по своим свойствам близок к свойствам белкового препарата, мог рассматриваться как другой оригинальный препарат, требуется убедительное доказательство, что пептид по клинической эффективности превосходит белковый препарат» [11].

Заключение

Разработке новых эффективных методов терапии редких заболеваний и внедрению современных методов их диагностики придается особое значение, поскольку такие заболевания начиная с раннего возраста могут привести к инвалидизации и смертности пациентов. В связи с тем, что разработка орфанных препаратов является высокочрезвычайно затратным мероприятием, в медицинскую практику актуально внедрение биоподобных качественных препаратов. Опыт применения биоподобных лекарственных препаратов свидетельствует о том, что конкурентное использование биоподобных препаратов создает преимущества для системы здравоохранения, поскольку позволяет пациентам получать лечение эффективными биотерапевтическими препаратами соответствующего качества. Однако требования к доказательству подобия вновь разработанных препаратов, заявляемых как биоподобные, предназначенные для лечения редких заболеваний, отличаются от других групп биоподобных биотерапевтических препаратов, применяемых для лечения других, не орфанных заболеваний. Все это требует совершенствования отечественной нормативной базы, регламентирующей условия регистрации биоподобных препаратов с учетом требований, предъявляемых для орфанных препаратов, а также гармонизации с международными требованиями, что будет способствовать оказанию качественной медицинской помощи пациентам, страдающим редкими заболеваниями.

6. Олефир Ю.В., Дигтярь А.В., Рычихина Е.М. Предпосылки и цели установления орфанного статуса лекарственного препарата. Мировой опыт и требования законодательства Российской Федерации. Аналитический обзор. *Международ. журн. прикладных и фундаментальных исследований*. 2016; 6: 335–53.
7. Новиков В.П. Правовые аспекты редких (орфанных) заболеваний в России и в мире. *Медицина*. 2013; 4: 53–73.
8. Бунятыян Н.Д., Васильев А.Н., Гавришина Е.В., Ниязов Р.Р. и др. Орфанные лекарственные препараты: США, Европейский союз и Россия. *Ремедиум*. 2013; 11: 47–52.

9. Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Медуницын Н.В. и др. Орфанные препараты, принципы их регистрации и применения. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2015; 3 (55): 4–16.

10. Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Оленин Ю.В. и др. Орфанные препараты для лечения редких болезней. Сибир. науч. мед. журн. 2017; 37 (2): 27–35.

11. Guidance for Industry Interpreting Sameness of Monoclonal Antibody Products Under the Orphan Drug Regulations U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Office of Orphan Products Development (OODP). April 2014 CMC.

12. Kataria M.K., Garg M., Anand V., Bilandi A. et al. An insight on regulations governing orphan diseases and drugs. Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. (RJPBCS). 2011; 2 (3): 373–85.

13. Guideline on Similar Biological Medicinal Products (CHMP/437/04).

14. Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Quality Issues (EMA/CHMP/BWP/49348/2005).

15. Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues (EMA/CHMP/BWP/42832/2005).

16. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1) EMA/CHMP/BWP/247713/2012. London. 22 May 2014. Effective date: 1 December 2014.

17. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva: World Health Organization, 19 to 23 October 2009.

■ References

1. McGabe C., Claxton K., Tsuchiya A. Orphan drugs and the NHS: should we value rarity? *BMJ*. 2005; 331: 1016–9.

2. FDA, Orphan Drug Regulations Proposed Rule, 56 FR 3338 (Jan. 29, 1991).

3. FDA, Orphan Drug Regulations Final Rule, 57 FR 62076 (Dec. 12, 1992).

4. FDA, Orphan Drug Regulations Final Rule, 78 FR 35117 (June 12, 2013).

5. Novikov P.V. The problem of rare (orphan) diseases in the Russian Federation: medical and regulatory aspects of its solution. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2014; 86 (12): 3–12. (in Russian)

6. Olefir Yu.V., Digtyar' A.V., Rychikhina E.M. Background and purpose of establishing orphan status of the drug. International experience and the requirements of the legislation of the Russian Federation. Analytical review. *Mezhdunarodniy zhurnal prikladnikh i fundamental'nikh issledovaniy*. 2016; (6): 335–53. (in Russian)

7. Novikov P.V. Legal aspects of rare (orphan) diseases in Russia and in the world. *Meditsina*. 2013; (4): 53–73. (in Russian)

8. Bunyatyan N.D., Vasil'ev A.N., Gavrishina E.V., Niyazov R.R. et al. Orphan drugs: USA, European Union and Russia. *Remedium*. 2013; (11): 47–52. (in Russian)

9. Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Medunitsyn N.V. et al. Orphan drugs and the principles of their marketing authorization procedures and clinical use. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015; 3 (55): 4–16. (in Russian)

10. Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Olefir Yu.V. et al. Orphan medicines towards rare diseases treatment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 37 (2): 27–35. (in Russian)

11. Guidance for Industry Interpreting Sameness of Monoclonal Antibody Products Under the Orphan Drug Regulations U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Office of Orphan Products Development (OODP). April 2014 CMC

12. Kataria M.K., Garg M., Anand V., Bilandi A. et al. An insight on regulations governing orphan diseases and drugs. *Res J Pharm Biol Chem Sci. (RJPBCS)*. 2011; 2 (3): 373–85.

13. Guideline on Similar Biological Medicinal Products (CHMP/437/04).

14. Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Quality Issues (EMA/CHMP/BWP/49348/2005).

15. Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues (EMA/CHMP/BWP/42832/2005).

18. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). Annex 2. WHO Technical Report Series No. 977, 2013.

19. Guidance for Industry. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Biosimilarity. February. 2012.

20. Guidance for industry. Quality consideration in demonstrating biosimilarity of a therapeutic protein product to a reference product. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). April 2015.

21. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К, 2013.

22. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. IV. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛУС, 2014.

23. Kabat E.A. The structural basis of antibody complementarity. *Adv. Protein Chem.* 1978; 3: 1–75.

24. Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed.). National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 1991.

25. Lefranc M.P., Pommie C., Ruiz M., Giudicelli V. et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27: 55–77.

26. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.

27. Max E.E. Immunoglobulins: molecular genetics. *Fundamental Immunology*. 3rd ed. / ed. W.E. Paul. Philadelphia, 1993: 315–82.

28. Burrows P.D., Schroeder H.W., Cooper M.D. B-cell differentiation in humans. *Immunoglobulin Genes*. 2nd ed. / eds T. Honjo, F.W. Alt. 1995: 3–32.

16. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1) EMA/CHMP/BWP/247713/2012. London. 22 May 2014. Effective date: 1 December 2014.

17. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva: World Health Organization, 19 to 23 October 2009.

18. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). Annex 2. WHO Technical Report Series No. 977, 2013.

19. Guidance for Industry. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Biosimilarity. February. 2012.

20. Guidance for industry. Quality consideration in demonstrating biosimilarity of a therapeutic protein product to a reference product. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). April 2015.

21. Guideline for the examination of drugs. Vol. I. Moscow: Grif i K, 2013. (in Russian)

22. Guideline for the examination of drugs. Vol. IV. Moscow: POLIGRAF-PLYuS, 2014: 172 p. (in Russian)

23. Kabat E.A. The structural basis of antibody complementarity. *Adv. Protein Chem.* 1978; 3: 1–75.

24. Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. (5th Eds.). National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services; 1991.

25. Lefranc M.P., Pommie C., Ruiz M., Giudicelli V. et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp Immunol.* 2003; 27: 55–77.

26. Yarin A.A. *Immunologiya*. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. (in Russian)

27. Max E.E. Immunoglobulins: Molecular Genetics. In: W.E. Paul (ed.). *Fundamental Immunology*. 3rd ed. Philadelphia, 1993: 315–82.

28. Burrows P.D., Schroeder H.W., Cooper M.D. B-Cell Differentiation in Humans. In: T. Honjo, F.W. Alt (eds). *Immunoglobulin Genes*. 2nd ed. 1995: 3–32.

© Коллектив авторов, 2019

Белоглазов В.А., Лугачев Б.И.

Молекулярные механизмы роли Толл-подобных рецепторов 4-го типа и убиквитин-модифицирующего фермента А 20 в патогенезе бронхиальной астмы

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», 295051, Симферополь, Россия

Численность больных во всем мире, страдающих бронхиальной астмой, убеждает в серьезности и важности этой проблемы. Несмотря на попытки ученых объединить усилия в борьбе с этим заболеванием, уровень смертностей и госпитализаций с каждым годом растет. Основная масса исследований посвящена изучению молекулярных механизмов патогенеза бронхиальной астмы. В этом обзоре описана роль Толл-подобных рецепторов 4-го типа (TLR4) в патогенезе бронхиальной астмы, рассмотрены процессы передачи сигнала с вовлечением адаптерных протеинов, а также влияние процессов убиквитинирования и роли убиквитина А 20 на активацию воспалительного ответа.

Ключевые слова: бронхиальная астма; TLR4; липополисахарид; TNFAIP3; А 20

Статья поступила 11.09.2018. Принята в печать 16.11.2018.

Для цитирования: Белоглазов В.А., Лугачев Б.И. Молекулярные механизмы роли Толл-подобных рецепторов 4-го типа и убиквитин-модифицирующего фермента А 20 в патогенезе бронхиальной астмы. Иммунология. 2019; 40 (1): 62–67. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11007.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Белоглазов Владимир Алексеевич –
доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой
внутренней медицины № 2
Медицинской академии
им. С.И. Георгиевского
ФГАОУ ВО «Крымский
федеральный университет
им. В.И. Вернадского»,
Симферополь, Россия
E-mail: biloglazov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9640-754X>

Beloglazov V.A., Lugachov B.I.

Molecular mechanisms of the role of Toll-like 4 receptors and ubiquitin-editing enzyme A 20 in the pathogenesis of bronchial asthma

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky Crimean Federal University, 295051, Simferopol, Russia

The number of patients suffering from bronchial asthma all over the world is convinced of the seriousness and importance of this problem. Despite the attempts of scientists to unite efforts in the fight against this disease, the level of deaths and hospitalizations is growing every year. The bulk of the research is devoted to the study of the molecular mechanisms of the pathogenesis of bronchial asthma. This review describes the role of Toll-like type 4 receptors (TLR4) in the pathogenesis of bronchial asthma, the processes of signal transfer involving adapter proteins, as well as the effect of ubiquitination processes and the role of ubiquitin A 20 on the activation of the inflammatory response are examined.

Keywords: bronchial asthma; TLR4; lipopolysaccharide; TNFAIP3; A 20

Received 11.09.2018. Accepted 16.11.2018.

For citation: Beloglazov V.A., Lugachov B.I. Molecular mechanisms of the role of Toll-like 4 receptors and ubiquitin-editing enzyme A 20 in the pathogenesis of bronchial asthma. Immunologiya. 2019; 40 (1): 62–7. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11007. (in Russian)

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For correspondence
Beloglazov Vladimir A. – MD,
Professor, Head of the Department
of Internal Medicine # 2,
Medical Academy named
after S.I. Georgievsky,
Vernadsky Crimean Federal
University, Simferopol, Russia
E-mail: biloglazov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9640-754X>

Бронхиальная астма (БА) – глобальная проблема здравоохранения, касающаяся всех возрастных групп. Несмотря на то что в последние десятилетия этой патологии уделяют особое внимание, численность страдающих БА возрастает, нанося непомерно внушительный ущерб.

Основные исследования этого заболевания посвящены тонким патогенетическим механизмам на молекулярном уровне. Несмотря на это, количество госпитализаций и смертельных случаев все еще высоко, и существует ряд неясностей в подходе к лечению.

Воспалительный процесс в бронхах ассоциирован с участием различных клеток и медиаторов, степень которых варьирует в зависимости от фенотипа заболевания. Чрезмерное увеличение заболеваний в последние годы объясняют как влиянием эпигенетических факторов, так и воздействием различных факторов окружающей среды. Последнее утверждение объясняется гигиенической теорией [1], которая заключается в увеличении аллергических заболеваний вследствие снижения микробной нагрузки на ребенка [1, 2]. Улучшение условий жизни и снижение контакта с бактериальными антигенами создает условия для созревания иммунной системы в стерильных условиях, приводящие к преобладанию Т-хелперов 2-го типа (повышение синтеза Ig E) над Т-хелперами 1-го типа [3, 4]. Существуют данные проведенных исследований о влиянии эндотоксина грамотрицательных бактерий или липополисахарида (ЛПС) на развитие иммунного ответа. При попадании в организм ЛПС связывается с специфическим транспортным белком – LBP (Lipopolysaccharide binding protein) и в дальнейшем распознается рецепторным комплексом CD14/TLR 4/MD2 [IL-1 receptor type/TLR 4 – Toll-like receptor 4 (CD 284); CD14 мембранный гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок; MD2 – лимфоцитарный антиген 96], который экспрессируется на поверхности макрофагов, моноцитов, гранулоцитов.

Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLRs) – образраспознающие рецепторы (pattern recognition receptors – PRR) – семейство рецепторов клеток системы врожденного иммунитета, которые играют роль первичных сенсоров продуктов микробного генеза, трансдуцирующие сигнал опасности от патогенов и участвуют в мобилизации иммунной системы на борьбу с инфекционными агентами. Они распознают липиды, пептиды, углеводы и нуклеиновые кислоты, экспрессируемые разными микроорганизмами, PAMP (pathogen-associated molecular patterns). TLRs запускают реакции врожденного и приобретенного иммунитета посредством сигнального каскада, реализуемого через факторы транскрипции NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) и AP1 (activator protein 1), которые ответственны за выработку провоспалительных цитокинов. Также в результате трансдукции сигнала посредством TLR4 активируется фактор транскрипции IRF (interferon response factor), регулирующий экспрессию интерферонов (ИНФ). По данным последних исследований, экспонируемый на клеточной поверхности TLR4 может распознавать и активироваться эндогенными лигандами, в частности белками теплового шока HSP60, HSP70, GPR96, фибронектином, гиалуриновой кислотой, фибриногеном и гепарином сульфат, что позволяет предположить роль этих рецепторов в регуляции воспаления при инфекционных и неинфекционных заболеваниях [5, 6].

Эффект TLR4 опосредуется сетью адаптеров внутриклеточной трансдукции, которые с мембраны клеток передают в ядро сигнал, активирующий гены иммунного ответа. После связывания с лигандом TLR4 происходит

димеризация, и измененная при этом конформация привлекает к цитоплазматической части TLR – TIR-домену (toll-interleukin 1 receptor domain) адаптерные протеины, содержащие TIR-домен. Формирующаяся при этом сигналосома состоит из цитоплазматической части рецептора и одного из двух содержащих TIR-домен адаптерных протеинов: MyD88 – TIRAP/Mal и TRAM – TRIF/Ticam 1. Активация NFκB посредством TLR4 происходит по MyD88-зависимому пути. TIRAP/Mal (TIR-domain containing adaptor protein/MyD88 adapter-like) выступает в роли посредника, обеспечивающего связывание MyD88 с TLR4. Адаптер TRAM/Ticam2 (TIR-domain containing adaptor molecule-2) обеспечивает связь TRIF (TIR-domain containing adaptor inducing interferon-beta) с TLR4, с последующей активацией IRF-3, регулирующего экспрессию интерферонов. Существует еще 5-й адаптер – SARM (sterile alpha and armadillo-motif containing protein), который функционирует как специфический ингибитор TRIF-зависимой сигнализации TLR [7].

MyD 88 (Myeloid differentiation primary response gene88) – универсальный адаптерный белок, взаимодействующий со всеми TLRs, кроме TLR3. В передачу сигналов через MyD88 вовлечено семейство серин/треонинкиназ IRAK1, IRAK4 (IL-1 receptor associated kinase). Важным событием в активации провоспалительного сигнала является взаимодействие IRAK4 с MyD88, в результате которого происходит гиперфосфорилирование IRAK1 и привлекается активатор канонического NFκB-пути – TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) в TLR-комплекс. В дальнейшем IRAK1 и TRAF6 диссоциируют из образовавшегося комплекса и взаимодействуют с мембраноассоциированной киназой TAK1 (MAP3K7 – mitogen-activated protein kinase 7) и вспомогательными белками TAB1 и TAB2. Индукция диссоциации IRAK1 из комплекса в результате фосфорилирования TAK1 и TAB2 приводит к активации ИКК и митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК). Вследствие убиквитинирования TRAF6 происходит активация NFκB. ИКК (IκB киназный комплекс) – сигнальный белковый комплекс, который регулирует транскрипционную активность NFκB, состоящий из 3 субъединиц (ИКК α , ИКК β , ИКК γ (NEMO) – регулятор). ИКК-комплекс фосфорилирует ингибитор IκB по остатку серина, для последующего гидролиза мультикаталитическими ферментными комплексами в протеосомах [8, 9]. Благодаря этому механизму происходит димеризация и ядерная транслокация NFκB с последующей экспрессией провоспалительных цитокинов (ОНФ- α , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12) и хемокинов (CXCL8/ИЛ-8), костимуляторных молекул B 7.1 (CD80) и B 7.2 (CD86).

Использование адаптеров TRIF и TRAM инициирует позднюю фазу активации NFκB, а также индуцирует экспрессию ИНФ-индуцибельных генов через фактор транскрипции IRF3 (см. рисунок).

В качестве эндогенного стимулятора TLR4 выступает белок HMGB1 (High mobility group box 1), или амфотерин, который является целью многих исследо-

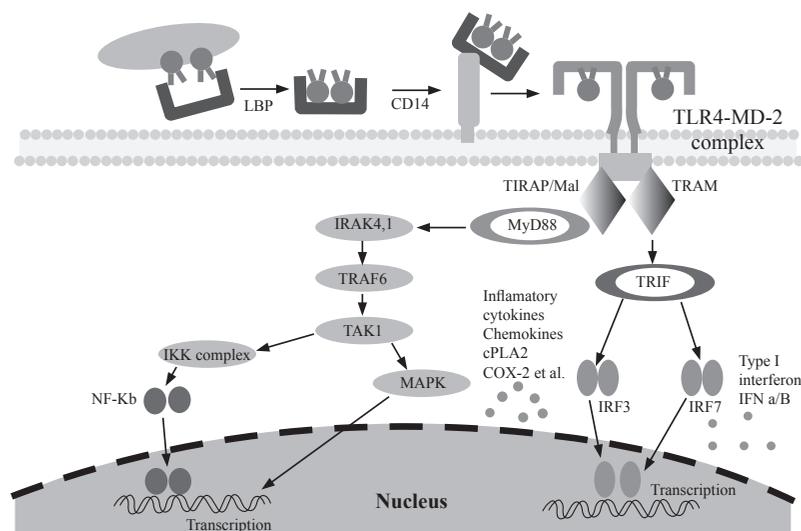


Схема сигнального пути TLR4

ваний в изучении аллергической природы БА. HMGB1 принадлежит к группе ядерных негистоновых ДНК-связывающих белков, которые ассоциируются с хроматином и обладают способностью изгибать ДНК, что облегчает связывание с другими белками. Также проявляет хемоаттрактантную и цитокиновую активность при секреции его макрофагами, моноцитами и дендритными клетками. Транслокация амфотерина зависит от посттрансляционной молификации. HMGB1, не подвергаясь ацетилированию, остается в ядре, но гипер-ацетилирование на остатках лизина заставляет его транслоцировать в цитозоль. Взаимодействие HMGB1 с TLR4 приводит к усилению активности NFκB и MAPK, а также стимулирует нейтрофилы продуцировать активные формы кислорода оксидазой НАДФ. Усиление активности транскрипционных факторов за счет действия на адаптерные протеины (в частности MyD88) [10–15].

Существуют данные исследований о TLR4-стимуляции продуцирования ИЛ-13 тучными клетками. Подобный механизм, лежащий в основе того, как TLR4 стимулируют продуцирование Th2-цитокинов, оставался неясным. В исследовании определяли уровень экспрессии рецептора лейкотриена B4 (BLT2) и синтез его лигандов после ЛПС стимуляции. Ученые продемонстрировали, что после стимуляции TLR4 каскад MyD88 – BLT2 приводит к образованию активных форм кислорода посредством НАДФ-оксидазы, при котором активируется NFκB, опосредуя синтез ИЛ-13 тучными клетками. Блокирование BLT2 вызывает обратный эффект [16].

В последнее время все больше информации накапливается об однонуклеотидных полиморфизмах (single nucleotid polymorphism, SNP) генов TLR4 и адаптерных протеинах. В результате замены нуклеотидов формируются специфические аллели генов, приводящих к нарушению активации иммунных клеток. Действие ЛПС на TLR4, как правило, обладает протективными свойствами по отношению к БА путем стимуляции и при-

влечения Т-хелперов 1-го типа (Th1), но чрезмерное поступление его в организм ингаляционно, или путем транслокации из кишечника вызывает обратный эффект, возникает Th₁/Th₂-дисбаланс, что приводит к ухудшению течения заболевания [17]. По данным метаанализа наличие полиморфного участка rs4986791 гена *TLR4* связано с повышенным риском развития БА [18–20]. Однонуклеотидная замена аденина (A) на гуанин (G) в полиморфном участке rs4986790 гена *TLR4* у пациентов с разными генотипами связана с риском развития БА раннего начала. У пациентов с поздним началом астмы с генотипом AA наблюдалась повышенная активация гуморальных эндотоксинсвязывающих систем и дефицит местного эндобронхиального иммунитета [21, 22].

Изучение полиморфизма рецептора CD14 (C159T) и растворимой фракции (sCD14) у больных с БА с учетом разных генотипов не связано с риском развития данной патологии, но имеются существенные изменения, связанные с дисбалансом местных эндотоксин-связывающих систем и увеличением sCD14 в индуцированной мокроте [23, 24]. Полиморфизм C260T гена *CD14* у пациентов с генотипом ТТ ассоциировался с затяжным и осложненным течением нозокомиальной пневмонии [25].

Наличие полиморфных маркеров гена универсального адаптерного протеина MyD88, в частности интронный вариант rs6853 в нетранслируемой части гена, ассоциирован с недостаточностью клеточного и гуморального иммунитета при вакцинации против вируса кори [26]. Фенотипические проявления SNP в нетранслируемой части гена, как правило, связаны с нарушением сплайсинга интронов, что приводит к делеции экзонных последовательностей и образованию aberrантной мРНК. Полиморфизм гена *MyD88* в 938-м положении (C > A) с учетом разных генотипов связан с повышенной восприимчивостью к туберкулезу и может служить маркером для выявления лиц, которые подвержены риску данного заболевания [27].

В передачу сигнала от TLR4 вовлечен убиквитин – белок, который ковалентно связывает белковые субстраты в ходе трансдукции с участием ферментов. Убиквитинирование – один из важнейших механизмов посттрансляционной регуляции свойств и функций белков. Процесс убиквитинирования белков происходит в несколько стадий, ферменты, катализирующие его отдельные этапы, получили условные названия E1 (убиквитин-активирующий фермент), E2 (убиквитин-конъюгирующий фермент) и E3 (убиквитинлигаза). Убиквитин имеет 7 остатков лизина и N-конец, которые могут служить точками присоединения последующих молекул убиквитина: это остатки лизина в положениях K6, K11, K27, K29, K33, K48 и K63. Полиубиквитиновые цепочки, образованные связью через остаток лизина-63, не связаны с протеасомальной деградацией белка-субстрата; они играют ключевую роль в координации других процессов, таких как направленный эндоцитоз, воспаление, трансляция и репарация ДНК [28]. При помощи полиубиквитиновых цепочек, образованных связью через остаток лизина-48, помечаются белки-мишени, подлежащие протеолитическому распаду. Такие регуляторы NFκB-пути, как TRAF6 и IKKγ(NEMO), претерпевающие Lys-63-полиубиквитинирование, не подвергаются протеолизу, а напротив, повышают активность NFκB. Рассматривая состояние гомеостаза, TLR4 постоянно подвергаются стимуляции антигенами производных резидентной и транзитной микрофлоры, но формирование воспалительного ответа на стимуляцию рецепторов возникает при достаточно высокой дозе лиганда, обусловленной агрессией патогена. В качестве ограничителя экзогенных TLR4-индуцируемых сигналов выступает убиквитинмодифицирующий фактор A 20, который приводит к последующей терминации NFκB-пути. Убиквитин A 20 кодируется геном *TNFAIP3* [29, 30].

По мнению J.E. Nutti и соавт., при трансдукции сигнала путем TLR4 активация IKKβ приводит к транскрипции генов, среди которых присутствует убиквитин A 20. IKKβ фосфорилирует транслируемый убиквитин A 20 по Ser-381, впоследствии усиливая активность последнего и последующей супрессии NFκB-пути [31].

Убиквитин A 20 представляет собой цитоплазматический белок со структурой цинкового пальца. Принимает участие в регуляторных иммунных и воспалительных реакциях, трансдуцируемых цитокинами TNF-α и ИЛ-1β, а также патогенами через Toll-подобные рецепторы (TLR) путем супрессии активности NFκB и ингибирования TNF-индуцированного клеточного апоптоза. Убиквитин A 20 проявляет активность как убиквитинлигазы, так и деубиквитиказы [32]. Так, A 20 подавляет NFκB-путь через совместную активность своих доменов при терминации TNF-опосредованного клеточного апоптоза. N-концевой домен A 20, являющийся деубиквитирующим фрагментом, удаляет Lys-63-связанные цепи убиквитина из белка, взаимодействующего с рецептором RIP1 (receptor-interacting serine/threonine kinase 1, RIPK1), основного медиатора проксимального рецептора TNFR1. C-концевой домен A 20 функционирует как убиквитин-

лигаза, посредством полиубиквитинирования RIP1 с Lys-48-связанными цепями убиквитина, нацеливая RIP1 на протеасомальную деградацию [33].

Подавление NFκB-пути TLR4-опосредованного сигнала, осуществляемого убиквитином A 20, происходит с помощью компонентов белкового комплекса, таких как TAX1BP1 (Tax1-binding protein 1), RNF11 (RING finger protein 11) и ITCN (Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase). Вследствие убиквитинирования TRAF6 происходит активация NFκB путем повышенной деградации IκBα при взаимодействии между TRAF6 и ферментами E2-убиквитина (Ubc13 и UbcH5c). A 20 совместно с TAX1BP1 ингибирует активность E3-лигазы TRAF6 путем антагонистических взаимодействий с конъюгирующими E2-убиквитин ферментами Ubc13 и UbcH5c с последующей протеосомной деградацией последних. Данный механизм приводит к последующей терминации NFκB-пути [34].

Исходя из данных о роли убиквитина A 20 в терминации TLR4-индуцируемых сигналов проводились исследования в изучении A 20 как терапевтической мишени на культурах эпителиальных клеток дыхательных путей *in vitro*. Были изучены молекулярные механизмы усиления TNF-опосредованной индукции убиквитина A 20 посредством таргетного воздействия на глюкокортикостероидные рецепторы, при котором наблюдалось увеличение экспрессии TNFAIP3 [35]. Также повышенная индукция убиквитина A 20 была изучена на культурах эпителия дыхательных путей *in vitro* при комбинированном воздействии будесонида и формотерола. В результате β₂-агонисты длительного действия оказывали протективное действие в сверхэкспрессии TNFAIP3 совместно с ингаляционными глюкокортикостероидами [36].

TLR4 являются идеальной терапевтической мишенью для таргетного воздействия. Проведенные на начальных этапах клинические исследования в рамках изучения эффективности и безопасности агонистов TLR4 показали перспективные результаты в иммунотерапевтическом лечении аллергической БА [37–39].

На основании анализа литературных данных, по мнению M.J. Schuijs с соавт., обнаружено, что низкая экспрессия A 20 приводит к снижению барьерной функции эпителия. Полиморфизм гена TNFAIP3, дефицит убиквитина A 20 может проявляться в виде множественных иммунных нарушений, в частности в виде ассоциации с повышенным риском астмы и экземы [40].

Наиболее изучена на сегодняшний день связь убиквитина A 20 с патогенезом и проявлениями пищевой аллергии, хронического гепатита, хронического гастрита, пневмонии. В то время как исследование клинического течения БА у людей в аспекте данного механизма остается не до конца изученной проблемой.

На основании данных литературного обзора о роли TLR4-опосредованной сигнализации и убиквитина A 20 планируется изучение и анализ ассоциации экспрессии гена *TNFAIP3* и его полиморфного маркера rs2230926, уровня растворимого рецептора sCD14 и уровня LBP с клиническим течением БА.

■ Литература

1. Strachan D.P. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ*. 1989; 299: 1259–60.
2. Matricardi P.M., Bouygue G.R., Tripodi S. Inner-city asthma and the hygiene hypothesis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2002; 89 (6): 69–74.
3. Holgate S.T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.* 2012; 18 (5): 673–83.
4. Смирнова О.В., Выхристенко Л.П. Роль клеток системы иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы. *Мед. новости*. 2011; 5: 18–9.
5. Tsan M.F., Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 76 (3): 514–9.
6. Киселев В.И., Малайцев В.В., Свешников П.Г. Функции белков теплового шока в системе адаптивного иммунитета. Конструирование вакцин // *Журн. микробиол.* 2007. № 6. С. 108–117.
7. O'Neill L.A., Bowie A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7 (5): 353–64.
8. Verstrepen L., Bekaert T., Chau T.L. et al. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65 (19): 2964–78.
9. Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008; 42 (2): 145–51.
10. Di Candia L., Gomez E., Venereau E., Chachi L. et al. HMGB1 is upregulated in the airways in asthma and potentiates airway smooth muscle contraction via TLR4. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; 140 (2): 584–7.
11. Park J.S., Gamboni-Robertson F., He Q., Svetkauskaite D. et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Cell. Physiol.* 2006; 290 (3): 917–24.
12. Hreggvidsdóttir H.S., Lundberg A.M., Aveberger A.C. et al. High mobility group box protein 1 (HMGB1)-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor. *Mol. Med.* 2012; 18: 224–30.
13. Qiao J.Y., Song L., Zhang Y.L., Luan B. HMGB1/TLR4/NF-kB signaling pathway and role of vitamin D in asthmatic mice. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2017; 19 (1): 95–103.
14. Klune J.R., Dhupar R., Cardinal J., Billiar T.R. et al. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol. Med.* 2008; 14 (7–8): 476–84.
15. Bianchi M.E. HMGB1 loves company. *J. Leukoc. Biol.* 2009; 86 (3): 573–6.
16. Lee A.J., Ro M., Kim J.H. Lipopolysaccharide/TLR4 stimulates IL-13 production through a MyD88-BLT2-linked cascade in mast cells, potentially contributing to the allergic response. *J. Immunol.* 2017; 199 (2): 409–17.
17. Simpson A., Martinez F.D. The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans. *Clin. Exp. Allergy*. 2010; 40 (2): 209–23.
18. Zhao J., Shang H., Cao X. et al. Association of polymorphisms in TLR2 and TLR4 with asthma risk: an update meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96 (35): 7909.
19. Li S., Xie X., Song Y., Jiang H. et al. Association of TLR4 (896A/G and 1196C/T) gene polymorphisms with asthma risk: a meta-analysis. *Med. Sci. Monit.* 2015; 21: 3591–9.
20. Tizaoui K., Kaabachi W., Hamzaoui K., Hamzaoui A. Association of single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes with asthma risk: a systematic review and meta-analysis. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2015; 7 (2): 130–40.
21. Бисюк Ю.А., Курченко А.И., Кондратюк В.Е., Дубовой А.И. Иммунитет к эндотоксину и Asp299Gly полиморфизм гена TLR-4 у взрослых больных с ранним и поздним началом бронхиальной астмы. *Запорожский мед. журн.* 2015; 3 (90): 86–90.
22. Бисюк Ю.А., Курченко А.И., Кондратюк В.Е., Дубовой А.И. Asp299Gly полиморфизм гена TLR-4 и антиэндотоксиновый иммунитет у больных бронхиальной астмой. *Имунологія та алергологія: Наука і практика*. 2014; 3: 117–20.
23. Бисюк Ю.А., Белоглазов В.А., Дубовой А.И. С159Т полиморфизм гена рецептора CD14 у взрослых больных бронхиальной астмой в популяции Крыма. *Таврический мед.-биол. вестн.* 2013; 16 (3): 63.
24. Бисюк Ю.А. Связь полиморфизма С159Т-гена рецептора CD14 с антиэндотоксиновым иммунитетом у взрослых больных с ранним и поздним началом бронхиальной астмы. *Туберкулез, легеневі хвороби, віл-інфекція*. 2015; 1: 20.
25. Байгозина Е.А., Совалкин В.И. Влияние полиморфизма гена CD14 на течение и исход нозокомиальной пневмонии. *Мед. иммунология*. 2010; 12 (1–2): 95–102.
26. Dhiman N. et al. Associations between SNPs in toll-like receptors and related intracellular signaling molecules and immune responses to measles vaccine: preliminary results. *Vaccine*. 2008. Vol. 26, N 14. P. 1731–1736.
27. Aggelou K., Siapati E.K., Gerogianni I. et al. The -938C>A polymorphism in MYD88 is associated with susceptibility to tuberculosis: a pilot study // *Dis. Markers*. 2016. Article ID 4961086. 5 p.
28. Miranda M., Sorkin A. Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol. Interv.* 2007; 7 (3): 157–67.
29. Turer E.E., Tavares R.M., Mortier E. et al. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J. Exp. Med.* 2008; 205 (2): 451–64.
30. Min Y., Wi S.M., Kang J.A., Yang T. et al. Cereblon negatively regulates TLR4 signaling through the attenuation of ubiquitination of TRAF6. *Cell Death Dis.* 2016; 7 (7): e2313.
31. Hutt J.E., Turk B.E., Asara J.M. IkkappaB kinase beta phosphorylates the K63 deubiquitinase A20 to cause feedback inhibition of the NF-kappaB pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27 (21): 7451–61.
32. Catrysse L., Vereecke L., Beyaert R., van Loo G. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2014; 35 (1): 22–31.
33. Wertz I.E., O'Rourke K.M., Zhou H., Eby M. et al. Deubiquitination and ubiquitin-ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signaling. *Nature*. 2004; 430 (7000): 694–9.
34. Shembade N., Ma A., Harhaj E.W. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*. 2010. Vol. 327 (5969): 1135–9.
35. Sasse S.K., Altonsy M.O., Kadiyala V. et al. Glucocorticoid and TNF signaling converge at A20 (TNFAIP3) to repress airway smooth muscle cytokine expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2016; 311 (2): 421–32.
36. Altonsy M.O., Mostafa M.M., Gerber A.N., Newton R. Long-acting beta2-agonists promote glucocorticoid-mediated repression of NF-kB by enhancing expression of the feedback regulator TNFAIP3. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2017; 312 (3): 358–70.
37. Aryan Z., Rezaei N. Toll-like receptors as targets for allergen immunotherapy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2015; 15 (6): 568–54.
38. Simpson A., Martinez F.D. The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans. *Clin. Exp. Allergy*. 2010; 40 (2): 209–23.
39. Kuzmich N.N., Sivak K.V., Chubarev V.N., Porozov Y.B. et al. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines (Basel)*. 2017; 5 (4): pii: e34.
40. Schuijjs M.J., Willart M.A., Vergote K. et al. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science*. 2015; 349 (6252): 1106–10.

■ References

1. Strachan D.P. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ*. 1989; 299: 1259–60.
2. Matricardi P.M., Bouygue G.R., Tripodi S. Inner-city asthma and the hygiene hypothesis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2002; 89 (6): 69–74.
3. Holgate S.T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.* 2012; 18 (5): 673–83.
4. Smirnova O.V., Vykhristenko L.R. The role of cells of the immune system in the pathogenesis of bronchial asthma. *Meditsinskie novosti [Medical News]*. 2011; (5): 18–9. (in Russian)
5. Tsan M.F., Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 76 (3): 514–9.
6. Kiselev V.I., Malaytsev V.V., Svshnikov P.G. Functions of heat shock proteins in the system of adaptive immunity. Development of vaccines. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2007; (6): 108–7. (in Russian)
7. O'Neill L.A., Bowie A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7 (5): 353–64.
8. Verstrepen L., Bekaert T., Chau T.L. et al. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65 (19): 2964–78.
9. Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008; 42 (2): 145–51.
10. Di Candia L., Gomez E., Venereau E., Chachi L. et al. HMGB1 is upregulated in the airways in asthma and potentiates airway smooth muscle contraction via TLR4. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; 140 (2): 584–7.
11. Park J.S., Gamboni-Robertson F., He Q., Svetkauskaite D. et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Cell. Physiol.* 2006; 290 (3): 917–24.
12. Hreggvidsdóttir H.S., Lundberg A.M., Aveberger A.C. et al. High mobility group box protein 1 (HMGB1)-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor. *Mol. Med.* 2012; 18: 224–30.
13. Qiao J.Y., Song L., Zhang Y.L., Luan B. HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway and role of vitamin D in asthmatic mice. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2017; 19 (1): 95–103.
14. Klune J.R., Dhupar R., Cardinal J., Billiar T.R. et al. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol. Med.* 2008; 14 (7–8): 476–84.
15. Bianchi M.E. HMGB1 loves company. *J. Leukoc. Biol.* 2009; 86 (3): 573–6.
16. Lee A.J., Ro M., Kim J.H. Lipopolysaccharide/TLR4 stimulates IL-13 production through a MyD88-BLT2-linked cascade in mast cells, potentially contributing to the allergic response. *J. Immunol.* 2017; 199 (2): 409–17.
17. Simpson A., Martinez F.D. The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans. *Clin. Exp. Allergy*. 2010; 40 (2): 209–23.
18. Zhao J., Shang H., Cao X. et al. Association of polymorphisms in TLR2 and TLR4 with asthma risk: an update meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96 (35): 7909.
19. Li S., Xie X., Song Y., Jiang H. et al. Association of TLR4 (896A/G and 1196C/T) gene polymorphisms with asthma risk: a meta-analysis. *Med. Sci. Monit.* 2015; 21: 3591–9.
20. Tizaoui K., Kaabachi W., Hamzaoui K., Hamzaoui A. Association of single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes with asthma risk: a systematic review and meta-analysis. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2015; 7 (2): 130–40.
21. Bisyuk Yu.A., Kurchenko A.I., Dubovyi A.I., Kondratyuk V.E. Immunity to endotoxin and Asp299Gly polymorphism of TLR-4 in adult patients with early and late onset of asthma. *Zaporozhskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 3 (90): 86–90. (in Russian)
22. Bisyuk Yu.A., Kurchenko A.I., Dubovyi A. I., Kondratyuk V.E. Asp299Gly polymorphism of TLR-4 and anti-endotoxin immunity in patients with bronchial asthma. *Imunologiya ta alergologiya: Nauka i praktika*. 2014; (3): 117–20. (in Russian)
23. Bisyuk Yu.A., Beloglazov V.A., Dubovoy A.I. The C159T polymorphism in the gene of CD14 receptor in adult patients with bronchial asthma in the Crimea population. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskiy vestnik*. 2013; 16 (3): 63. (in Russian)
24. Bisyuk Yu.A. Relation of polymorphism C159T of CD14 receptor gene and anti-endotoxin immunity in adult patients with early and late asthma onset. *Tuberkul'oz, legkiyei khvorobi, vil-infektsiya. [Tuberculosis. Lung Diseases. HIV-Infection]*. 2015; (1): 20. (in Russian)
25. Baygozina E.A., Sovalkin V.I. Influence of CD14 gene polymorphism on clinical course and outcome of nosocomial pneumonia. *Meditsinskaya immunologiya*. 2010; 12 (1–2): 95–102. (in Russian)
26. Dhiman N. et al. Associations between SNPs in toll-like receptors and related intracellular signaling molecules and immune responses to measles vaccine: preliminary results. *Vaccine*. 2008. Vol. 26, N 14. P. 1731–1736.
27. Aggelou K., Siapati E.K., Gerogianni I. et al. The -938C>A polymorphism in MYD88 is associated with susceptibility to tuberculosis: a pilot study // *Dis. Markers*. 2016. Article ID 4961086. 5 p.
28. Miranda M., Sorkin A. Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol. Interv.* 2007; 7 (3): 157–67.
29. Turer E.E., Tavares R.M., Mortier E. et al. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J. Exp. Med.* 2008; 205 (2): 451–64.
30. Min Y., Wi S.M., Kang J.A., Yang T. et al. Cereblon negatively regulates TLR4 signaling through the attenuation of ubiquitination of TRAF6. *Cell Death Dis.* 2016; 7 (7): e2313.
31. Huttu J.E., Turk B.E., Asara J.M. IκB kinase beta phosphorylates the K63 deubiquitinase A20 to cause feedback inhibition of the NF-kappaB pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27 (21): 7451–61.
32. Catrysse L., Vereecke L., Beyaert R., van Loo G. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2014; 35 (1): 22–31.
33. Wertz I.E., O'Rourke K.M., Zhou H., Eby M. et al. Deubiquitination and ubiquitin-ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signaling. *Nature*. 2004; 430 (7000): 694–9.
34. Shembade N., Ma A., Harhaj E.W. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*. 2010. Vol. 327 (5969): 1135–9.
35. Sasse S.K., Altansy M.O., Kadiyala V. et al. Glucocorticoid and TNF signaling converge at A20 (TNFAIP3) to repress airway smooth muscle cytokine expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2016; 311 (2): 421–32.
36. Altansy M.O., Mostafa M.M., Gerber A.N., Newton R. Long-acting β₂-agonists promote glucocorticoid-mediated repression of NF-κB by enhancing expression of the feedback regulator TNFAIP3. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2017; 312 (3): 358–70.
37. Aryan Z., Rezaei N. Toll-like receptors as targets for allergen immunotherapy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2015; 15 (6): 568–54.
38. Simpson A., Martinez F.D. The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans. *Clin. Exp. Allergy*. 2010; 40 (2): 209–23.
39. Kuzmich N.N., Sivak K.V., Chubarev V.N., Porozov Y.B. et al. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines (Basel)*. 2017; 5 (4): pii: e34.
40. Schuijjs M.J., Willart M.A., Vergote K. et al. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science*. 2015; 349 (6252): 1106–10.

© Коллектив авторов, 2019

Богданова И.М., Болтовская М.Н.

Естественная селекция эмбрионов человека: иммунные механизмы контроля качества

ФГБНУ «НИИ морфологии человека» Минобрнауки России, 117418, Москва, Россия

Иммунная система матери вовлечена во все этапы репродуктивного процесса от зачатия до имплантации эмбриона и развития плаценты. Клетки иммунной системы распознают антигены и другие сигнальные молекулы семенной жидкости, эмбрионов и плаценты. В экспериментах на мышах было установлено, что при зачатии семенная жидкость в репродуктивном тракте самок индуцирует иммунный ответ, разрешающий или отменяющий беременность, т. е. контролирующей качество преимплантационных эмбрионов, а также запускает цепь событий, оказывающих влияние на последующее развитие плода. В частности, семенная жидкость инициирует процессы иммунной адаптации, необходимые для становления толерантности к трансплантационным антигенам отца (антигены главного комплекса гистосовместимости, или HLA, человека), представленным в сперматозоидах и наследуемым плодом. В оценке качества преимплантационных эмбрионов, а также в их селекции важная роль отводится децидуализированному эндометрию матки. В процессе децидуализации эндометриальные стромальные клетки (ЭСК) приобретают уникальную способность распознавать имплантирующиеся дефектные эмбрионы и элиминировать их, т. е. функционировать как биосенсор качества эмбрионов. Успех имплантации зависит от тесного взаимодействия бластоцисты и эндометрия матки, опосредуемого локально секретируемыми факторами. Важная функция децидуализированного эндометрия – временное приобретение рецептивного фенотипа, необходимое для внедрения бластоцисты в матку. Очевидно, отмена сенсорной функции связана с невозможностью эндометрия достигать рецептивного статуса, что является одной из причин бесплодия. В исследованиях, посвященных изучению природы и механизмов привычного невынашивания беременности, получены доказательства в поддержку гипотезы, согласно которой первопричиной данной патологии является нарушение контроля качества эмбрионов, что позволяет дефектным эмбрионам, предназначенным к удалению, беспрепятственно имплантироваться в матку и проявляться клинически как рецидивирующий выкидыш. Полагают, что дисбаланс регуляторных сигналов, которые контролируют дифференцировку ЭСК в специализированные децидуальные клетки, может лежать в основе данной патологии.

Ключевые слова: беременность; преимплантационные эмбрионы; иммунная система; естественная селекция; обзор

Статья поступила 10.11.2018. Принята в печать 16.11.2018.

Для цитирования: Богданова И.М., Болтовская М.Н. Естественная селекция эмбрионов человека: иммунные механизмы контроля качества. Иммунология. 2019; 40 (1): 68–73. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11008.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Bogdanova I.M., Boltovskaya M.N.

Natural selection of human embryos: immune mechanisms of quality control

Research Institute of Human Morphology, 117418, Moscow, Russia

The maternal immune system is involved in all stages of the reproductive process from conception to the implantation of the embryo and the development of the placenta and fetus. Cells of the immune system recognize antigens and other signaling molecules of seminal fluid, embryos and placenta. In experiments on mice, it was found that when conceiving, seminal fluid in the reproductive tract of females induces an immune response that allows or cancels pregnancy, i.e. controls the quality of preimplantation embryos, as well as a chain of events that affect the subsequent development of the fetus. In particular, the seminal fluid initiates the processes of immune adaptation necessary for the development of tolerance to the father's transplantation antigens (antigens of the major histocompatibility complex or human HLA), represented in the seminal fluid and inherited by the fetus. The decidualized endometrium of the uterus plays an important role in assessing the quality of preimplantation embryos, as well as in their selection. In the process of decidualization, endometrial stromal cells (ESCs) acquire a unique ability to recognize and eliminate implantable defective embryos, that is, to function as a biosensor for the quality of embryos. The success of

Для корреспонденции
Болтовская Марина Николаевна –
доктор биологических наук,
профессор, руководитель
лаборатории патологии репродукции
ФГБНУ «НИИ морфологии
человека» Минобрнауки России,
Москва, Россия
E-mail: maribolt@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9751-2066>

For correspondence
Boltovskaya Marina N. –
PhD, Professor, Head of
Reproductive Pathology Laboratory,
Research Institute
of Human Morphology
E-mail: maribolt@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9751-2066>

implantation depends on the close interaction of the blastocyst and the endometrium of the uterus mediated by locally secreted factors. An important function of the decidualized endometrium is the temporary acquisition of the receptive phenotype, which is necessary for the introduction of the blastocyst into the uterus. It is believed that the abolition of sensory function is associated with the inability of the endometrium to achieve receptive status, which is one of the causes of infertility. In studies on the nature and mechanisms of habitual miscarriage, evidence was obtained in support of the hypothesis that the root cause of this pathology is abnormal quality control, which allows defective embryos to be removed to implant freely in the uterus and manifests clinically as a recurrent miscarriage. It is believed that this pathology can be based on an imbalance of regulatory signals that control the differentiation of ESCs into specialized decidual cells.

Keywords: pregnancy; preimplantation embryos; immune system; natural selection; review

Received 10.11.2018. **Accepted** 16.11.2018.

For citation: Bogdanova I.M., Boltovskaya M.N. Natural selection of human embryos: immune mechanisms of quality control. *Immunologiya*. 2019; 40 (1): 68–73. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11008. (in Russian)

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Репродуктивная эффективность человека значительно ниже, чем у других видов млекопитающих. Вероятность достижения беременности в течение одного менструального цикла, определяемая как ежемесячный процент плодовитости (MFR), составляет 20–30% у человека, в то время как MFR может составлять 80% у бабуинов и 90% у кроликов. Прогресс в использовании вспомогательной репродуктивной техники привел к появлению множества пар, прошедших процедуру оплодотворения яйцеклеток *in vitro*, но только около половины полученных эмбрионов имплантируются после их переноса в матку и около половины из них теряются вскоре после имплантации. Однако высокая частота периимплантационных потерь связана не только с использованием методов вспомогательной репродукции. Первое указание на высокий периимплантационный отсев эмбрионов, характерный для человека, связано с исследованием Hertig и соавт. [1], включающим обследование 210 маток, полученных при гистерэктомии после овуляции. Из них только 34 содержали оплодотворенные яйцеклетки, дефектные, полноценные или индифферентные. Развитие чувствительного теста на беременность по определению уровня хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в образцах мочи привело к появлению работы Wilcox и соавт. [2], в которой были исследованы серийные образцы мочи 221 женщины, пытающейся забеременеть в течение 6 мес. При оценке уровня ХГЧ установлено, что имплантация происходит в 19% циклов, но более 1/3 затем теряется, в большинстве случаев до появления клинических признаков зачатия. Около 50% зачатий не приводит к наступлению беременности.

В данном обзоре представлены современные данные, свидетельствующие о важной роли семенной жидкости (СЖ), поступающей в женский репродуктивный тракт при половом сношении, которая не только способствует сохранению сперматозоидов и их способности к оплодотворению, но также содержит сигнальные молекулы, влияющие на репродуктивную физиологию, повышая шансы зачатия и успешной беременности.

Представлены растущее число экспериментальных доказательств, подтверждающих наличие биосенсорного компонента децидуализированного эндометрия, и данные о природе эмбриональных сигналов, детектируемых эндометрием, а также о биологических процессах, с помощью которых эти сигналы участвуют в запуске эндометриального ответа.

Семенная жидкость и иммунная адаптация к беременности

В настоящее время очевидно, что иммунная система матери распознает отцовские HLA-антигены в СЖ и тканях зародыша и способна генерировать иммунный ответ, приводящий к становлению толерантности к полуаллогенному плоду или к его отторжению. Через слущивание микрочастиц или экзосом синцитиотрофобласт плаценты обеспечивает постоянный источник антигенного материала, который персистирует у матери в течение всего срока беременности. В начале беременности в периферической крови у человека и грызунов обнаружены Т-клетки и антитела, реагирующие с отцовскими антигенами. Эти клетки активированы и начинают пролиферировать с момента зачатия или ранее, когда иммунная система матери впервые экспонирована с HLA-антигенами отца в СЖ. Инициация и поддержание беременности не всегда желательны, даже у перспективной матери – в случае, если самец-партнер не продуцирует достаточного количества гамет адекватного качества, например, вследствие инфекции, а также в условиях неблагоприятного окружения или при наличии у эмбриона аномалий развития или хромосомных нарушений. Очевидно, что роль материнской иммунной системы на этапе становления беременности должна состоять в том, чтобы эффективно отменять ее дальнейшее развитие в этих условиях. Фракция плазмы СЖ человека содержит многочисленные сигнальные молекулы, включая трансформирующий ростовой фактор (ТРФ)-β, интерлейкины (ИЛ)-1α, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-17, CXCL8, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), фактор некроза опухоли (ФНО)-α, фактор роста сосудистого эндо-

теля, а также простагландины и стероидные гормоны, которые взаимодействуют с эпителиальными клетками, выстилающими репродуктивный тракт самки, инициируя экспрессию генов, привлечение лейкоцитов и активацию клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Отрицательная реакция самки на СЖ самца включает приток воспалительных клеток (преимущественно нейтрофилов и макрофагов) в полость репродуктивного тракта самки, которые фагоцитируют и уничтожают поврежденные или медленнодвигающиеся сперматозоиды, потенциально отбирая пригодные для оплодотворения яйцеклетки [3–6].

В модельной системе на мышах показано, что ключевой эффект СЖ состоит в активации адаптивного иммунного ответа самки, способствующего наступлению успешной беременности, ассоциированной с установлением толерантности к антигенам самца, опосредуемой Т-клетками. Распознавание Т-клетками самки антигенов самца происходит после того, как эти антигены, представленные дендритными клетками самки, активируют CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки в лимфоузлах, дренирующих репродуктивный тракт [7]. На уровень и качество ответа влияет состав СЖ, содержащей антигены, иммунорегуляторные адьюванты и другие растворимые факторы, включая ТРФ-β и простагландин Е. СЖ, характеризующаяся слабой сигнальной активностью, содержит патогены, которые активируют Толл-подобные рецепторы или индуцирует несоответствующий фенотип (низкий уровень экспрессии вспомогательных молекул) в привлеченных воспалительных клетках, что приводит к слабой рецептивности эндометрия и, как следствие, к низкой вероятности наступления беременности. Активированные Т-клетки мигрируют в эндометрий в ответ на индуцируемые СЖ цитокиновые и хемокиновые сигналы. Когда СЖ содержит достаточное количество иммуномодулирующего цитокина ТРФ-β, происходит повышение числа супрессорных регуляторных Т-клеток (РТК), которые распознают антигены самца и подавляют иммунное отторжение, индуцируя и поддерживая толерантность матери на аллоантигены самца. СЖ играет ключевую роль в этом процессе. Так, у мышей искусственное зачатие в отсутствие СЖ приводит к нарушению эмбрионального развития. В этих условиях успех имплантации сомнителен. Появляются доказательства, свидетельствующие о подобных эффектах у женщин, когда СЖ индуцирует адаптивный иммунный ответ в тканях шейки матки после контакта при половом сношении. Этот биологический ответ может иметь клиническое значение, объясняя, почему предварительная экспозиция с СЖ при *in vitro* оплодотворении повышает вероятность наступления беременности. Между самцами существуют индивидуальные колебания состава СЖ, индуцирующей иммунный ответ самки, что может повысить шансы отдельных самцов на получение потомства и обеспечить самкам средство оценки репродуктивного потенциала самцов. Таким образом, способность СЖ генерировать РТК ответ может включать механизм детекции хорошего качества СЖ самками [8–11].

Эндометрий как сенсор качества преимплантационных эмбрионов у человека

Репродуктивный процесс у человека характеризуется высоким уровнем эмбриональных потерь. Предполагается наличие материнской стратегии, направленной на отмену нежелательной имплантации инвазивных, но аномальных или маложизнеспособных эмбрионов. Недавно выдвинутая гипотеза, согласно которой эндометрий является биосенсором, впервые подтверждена в системе сокультивирования эмбрион/децидуализированные стромальные клетки человека *in vitro*, а также в экспериментальной модели на мышах *in vivo* [12].

Процесс децидуализации эндометрия – необходимое условие для развития и поддержания беременности у всех видов млекопитающих с инвазирующимися эмбрионами, включая человека. Децидуализация – постовуляторный процесс трансформации эндометриальных стромальных фибробластов в специализированные секреторные децидуальные клетки (ДК) в ответ на подъем уровня прогестерона. В процессе децидуализации стромальные клетки приобретают уникальную способность регулировать такие важные процессы, как имплантация, формирование плаценты, инвазия цитотрофобласта, а также препятствуют развитию воспалительного и оксидативного стресса и подавляют локальный иммунный ответ матери на отцовские аллоантигены. Кроме того, децидуализированный эндометрий способен распознавать имплантирующиеся дефектные эмбрионы и элиминировать их, т. е. функционировать как биосенсор качества преимплантационных эмбрионов [13].

Одна из важных функций децидуализированного эндометрия – временное приобретение рецептивного фенотипа, необходимого для внедрения компетентной бластоцисты в оптимальное микроокружение в матке. В течение этого короткого периода (~48 ч), известного как окно имплантации, эндометрий экспрессирует эволюционно консервативный репертуар генов, определяющих ключевые события процесса имплантации. Этот период характеризуется повышением экспрессии некоторых эндометриальных ростовых факторов, цитокинов и других сигнальных молекул [14, 15]. Децидуализированный эндометрий также обеспечивает сигналы для завершения окна имплантации бластоцисты и определяет способность эндометрия распознавать и элиминировать имплантирующиеся дефектные эмбрионы. К настоящему времени представлено большое количество доказательств, подтверждающих высокий уровень хромосомных аномалий в ранних эмбрионах человека, наличие которых может быть причиной нарушения имплантации после *in vivo* и *in vitro* оплодотворения. При оплодотворении *in vitro* хромосомные аномалии, включая анеу-, поли- и гаплоидию регистрируют в более чем 50% преимплантационных эмбрионов [16]. Используя методику, позволяющую проводить геномный скрининг индивидуальных клеток, E. Vanneste и соавт. [17] показали, что менее 10% эмбрионов на стадии дробления, полученных от фертильных женщин в возрасте до 35 лет,

имеют нормальный кариотип во всех бластомерах, около 50% эмбрионов не содержат нормальных клеток вовсе, а оставшиеся имеют мозаичный крупномасштабный структурный дисбаланс, вызванный преимущественно нерасхождением митотических хромосом. Как полагают, отмена сенсорной функции и неспособность осуществлять естественную селекцию преимплантационных эмбрионов связана с невозможностью эндометрия достигать рецептивного статуса, что является одной из основных причин бесплодия [18, 19]. В то же время пролонгирование рецептивного статуса эндометрия нежелательно, так как может облегчать имплантацию нежизнеспособных эмбрионов, что прямо коррелирует с ранней потерей беременности [20]. Так как сайты имплантации человека недоступны для изучения *in vivo* по этическим причинам, наши представления о событиях, связанных с ранним сроком беременности, базируются на данных, полученных с использованием экспериментальных генно-инженерных моделей на мышах или на анализе генов, экспрессируемых в эндометрии человека, с целью идентификации факторов, обеспечивающих временный рецептивный фенотип, т. е. готовность матки к принятию бластоцисты. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для успешной имплантации необходимы активация эволюционно консервативных факторов транскрипции в эндометрии, таких как NOXA10, STAT3, p53, а также экспрессия ключевых клеточных молекул адгезии и их лигандов ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$ интегрин, тропонин, L-селектиновый лиганд) и некоторых ростовых факторов и цитокинов, важных для координантного двунаправленного взаимодействия бластоцисты с рецептивным эндометрием матки [21–23].

Доказательства, поддерживающие концепцию существования активной селекции эмбрионов человека при имплантации, получены в работах G. Teklenburg и соавт. [18]. Успех имплантации зависит от диалога между бластоцистой и эндометрием матки, опосредуемого локально секретлируемыми факторами. Для изучения механизмов взаимодействия между эмбрионом и децидуализированным эндометрием использовали метод сокультивирования единичных бластоцит, помещенных на конфлюентный монослой эндометриальных стромальных клеток (ЭСК), децидуализированных в течение 5 дней воздействием аналога циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и медроксипрогестерон ацетата. Определяли уровень 14 секретлируемых цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, предположительно участвующих в процессе имплантации. Авторы показали, что децидуализующиеся ЭСК продуцируют все тестируемые медиаторы, за исключением интерферона (ИФ)- γ . Присутствие эмбриона не влияет на продукцию ИЛ-12, и ИЛ-15, ФНО- α , моноцитарного хемотаксического белка 1 (МХБ)-1 или хемокинового лиганда 10 (IP-10). Эмбрионы с морфологически подтвержденным нарушением развития индуцируют мощный ответ в популяции ДК, выражающийся в избирательном ингибировании секреции ИЛ-1 β , -6, -10, -17, -18, зотаксина и гепарин-связывающего эпидермального ростового

фактора (ГС-ЭРФ). Очевидно, аномальные эмбрионы человека индуцируют значительно более высокий уровень цитокинового ответа в децидуализирующемся эндометрии, чем эмбрионы высокого качества, чья метаболическая активность и потребление питательных веществ, направленные только на поддержание роста и развития, ограничены, в то время как менее жизнеспособные эмбрионы дополнительно расходуют энергию на восстановление и апоптоз [12, 18, 24]. J.J. Brosens и соавт. [25] показали, что эмбрионы человека с нарушением развития вызывают эндоплазматический стресс-ответ в ДК человека. Наоборот, сигналы, исходящие от компетентных эмбрионов индуцируют активацию генов метаболических ферментов и факторов имплантации [26].

В отдельных экспериментах при сокультивировании эмбрионов с недифференцированными ЭСК регистрируют отсутствие ответа, что подтверждает гипотезу, согласно которой предполагаемая сенсорная функция ассоциирована с децидуальным фенотипом. Тем не менее 8 цитокинов, включая ИЛ-1 β , ИЛ-10 и ГС-ЭРФ, накапливаются в течение 3 дней в культуральной среде, но на их продукцию не влияет присутствие развивающихся или замерших эмбрионов.

Исследования природы и кинетики адаптивного иммунного ответа на ранних сроках беременности подтверждают роль лимфоцитов, реагирующих с отцовскими антигенами, в селекции в течение раннего морфогенеза плаценты. У человека успешное развитие беременности полностью зависит от генерирования достаточно большого количества РТК, подавляющих активность Т-хелперов-1 и -17, которые могут неблагоприятно влиять на прогрессирование гестации. У мышей причинная роль этого баланса очевидна, так как истощение РТК приводит к отмене или прерыванию беременности через нарушение процесса имплантации или индукцию выкидыша в зависимости от стадии беременности, в которой проводили истощение РТК. Экспериментально установлено, что РТК играют ключевую роль в фазе имплантации, а не на более поздних этапах беременности, так как истощение РТК пассивным введением анти-CD25-антител до имплантации приводит к отмене аллогенной беременности у мышей. В то время как СЖ играет важную роль в индукции РТК ответа в начале беременности, поддержание полезного для развития беременности соотношения РТК к Th1 и Th17 после имплантации зависит от сигналов плодного происхождения и находится под контролем факторов микроокружения. Цитокиновое микроокружение при ранней беременности определяет природу непрерывного Т-клеточного ответа, влияющего на иммунную толерантность матери и исход беременности. Например, у мышей TRF- β и ИЛ-10 считаются ключевыми цитокинами, определяющими толерогенный фенотип, в то время как активация Т-клеток, реагирующих с антигенами самца в присутствии Th1-цитокинов, приводит к выкидышу. Очевидно, периконцептуальные события и сигналы от СЖ могут продолжать влиять на иммунное микроокружение даже после имплантации зародыша [3].

Биологические доказательства в поддержку эмбриональной селекции получены в исследованиях, посвященных изучению природы и механизмов привычного невынашивания беременности (ПНБ). E. Serle и соавт. изучали процесс эндометриальной дифференцировки в периимплантационной фазе у женщин с ПНБ. При сравнительном анализе биопсийного материала эндометрия, полученного в средней секреторной фазе у женщин с ПНБ и нормальных фертильных женщин, было установлено, что ПНБ ассоциировано со сниженной секреторной функцией эпителиальных клеток, изменением состава маточного секрета и низким уровнем экспрессии муцина-1 – антиадгезивной молекулы, участвующей в барьерной функции люминального эпителия [27]. На основании результатов этих ранних исследований, сфокусированных на функции эпителиальных клеток и маркерах эндометриальной рецептивности, предложена гипотеза, согласно которой первопричиной ПНБ является нарушение контроля качества эмбрионов, что позволяет дефектным эмбрионам, предназначенным к удалению беспрепятственно имплантироваться в матку и затем проявляться клинически как рецидивирующий выкидыш [28, 29]. Одно из важных условий успешной имплантации – участие в этом процессе молекулярных механизмов, контролирующих взаимодействие ранних эмбрионов с эндометрием. К ним относится продукция многочисленных молекулярных факторов, участвующих в имплантации, включая эндометриальные интегрин, белки внеклеточного матрикса, молекулы адгезии, ростовые факторы и ионные каналы [30]. Также показано, что ЭСК секретируют проимплантационные медиаторы у мышей только в течение провоспалительной фазы децидуального процесса. При децидуализации ЭСК человека продуцируют ИЛ-33 – ключевой регулятор врожденного иммунного ответа. Взаимодействие ИЛ-33 с его трансмембранным рецептором индуцирует воспалительный ответ, который контролирует экспрессию генов рецептивности эндометрия во времени [20]. Неспособность бластоцисты имплантироваться в слизистую оболочку матки связана с нарушением децидуализации ЭСК [31].

Доказательства, свидетельствующие о нарушенной способности ЭСК экспрессировать децидуальный фенотип при ПНБ получены в серии экспериментов, в которых оценивали экспрессию двух маркерных генов – *PROK1* и *PRL*. *PROK1* кодирует вновь открытый цитокин, прокинетицин-1, способствующий становлению рецептивности эндометрия и взаимодействию эмбриона с эндометрием через индукцию лейкоз-ингибирующего фактора в эпителиальных клетках. Продукт *PRL* гена – пролактин является маркером ДК [19]. Уровень мРНК обоих маркерных генов

у пациенток с анамнезом ПНБ и женщин контрольной группы определяли в биопсиях эндометрия, забор которых был приурочен к периоду окна имплантации. Было установлено, что ПНБ ассоциирована со значительно более высоким уровнем эндометриальной мРНК *PROK1* и приблизительно в 100 раз более низким уровнем мРНК *PRL*, чем у женщин контрольной группы. Повышение эндометриальной экспрессии *PROK1* и снижение уровня *PRL* согласуется с концепцией, согласно которой повышенная рецептивность, но нарушенные процессы распознавания эмбриона и естественной селекции могут лежать в основе индукции ПНБ. Полагают, что дисбаланс регуляторных сигналов, которые контролируют дифференцировку ЭСК в специализированные ДК, может быть одной из причин данной патологии беременности. Очевидно, ПНБ является следствием неспособности ЭСК экспрессировать децидуальный фенотип. Аномальная децидуализация ЭСК может приводить к удлинению рецептивного периода для имплантации с одновременным снижением способности к осуществлению селективной функции ЭСК в ответ на качество эмбриона [18]. Это согласуется с ранее опубликованными данными, согласно которым существует связь между поздним сроком имплантации и доклинической потерей беременности. Оптимальный срок имплантации, определяющий наступление успешной беременности, составляет 8–10 дней после овуляции. Риск ранней потери беременности прогрессивно возрастает, если имплантация бластоцисты осуществляется в более поздние сроки [2]. Нарушение децидуализации эндометрия облегчает имплантацию, но в то же время предрасполагает к последующему прерыванию беременности или через удлинение окна имплантации и отмену естественной селекции эмбрионов, или путем подавления материнского ответа на эмбриональные сигналы.

Таким образом, можно утверждать, что существуют сложные положительные и отрицательные механизмы, посредством которых иммунная система матери осуществляет сенсорную функцию и принимает решение о судьбе эмбриона. Клетки иммунной системы воспринимают антигенные и другие сигналы СЖ, плаценты и тканей плода. Материнский иммунный контроль репродуктивного процесса заключается в объединении сигналов, отражающих репродуктивное качество и совместимость между самцом/партнером и плодом, с факторами микроокружения, которые влияют на вероятность успешного исхода беременности. Гипотеза иммуноопосредованного контроля качества эмбриона согласуется с биологическим фактом отмены беременности, особенно в случаях генетических дефектов или нарушений развития у плода, а также при неблагоприятных внешних условиях на данный момент.

■ Литература/References

1. Hertig A.T., Rock J., Adams E.C., Menkin M.C. Thirty-four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility; a study of biologic wastage in early human pregnancy. *Pediatrics*. 1959; 23(1, pt 2): 202–11.
2. Wilcox A.J., Baird D.D., Weinberg C.R. Time implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 1796–9.
3. Robertson S.A. Immune regulation of conception and embryo implantation—all about quality control? *J. Reprod. Immunol.* 2010; 85 (1): 51–7. doi: 10.1016/j.jri.2010.01.008.
4. Robertson S.A., Sharkey D.J. Seminal fluid and fertility in women. *Fertil. Steril.* 2016; 106 (3): 511–9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1101.
5. Robertson S.A., Care A.S., Moldenhauer L.M. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J. Clin. Invest.* 2018; 128 (10): 4224–35. doi: 10.1172/JCI122182.
6. Sharkey D.J., Tremellen K.P., Jasper M.J., Gemzell-Danielsson K. et al. Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *J. Immunol.* 2012; 188 (5): 2445–54. doi: 10.4049/jimmunol.1102736.
7. Moldenhauer L.M., Diener K.R., Thring D.M., Brown M.P. et al. Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T cell activation to initiate the female immune response to pregnancy. *J. Immunol.* 2009; 182 (12): 8080–93. doi: 10.4049/jimmunol.0804918.
8. Robertson S.A., Querin L.R., Moldenhauer L.M., Hayball J.D. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy – the contribution of seminal fluid. *J. Reprod. Immunol.* 2009; 83 (1–2): 109–16. doi: 10.1016/j.jri.2009.08.003.
9. Robertson S.A., Prins J.R., Sharkey D.J., Moldenhauer L.M. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013; 69 (14): 315–30. doi: 10.1111/aji.12107.
10. Robertson S.A., Moldenhauer L.M. Immunological determinants of implantation success. *Int. J. Dev. Biol.* 2014; 58 (2–4): 295–17. doi: 10.1387/ijdb.140096 sr.
11. Schjenken J.E., Robertson S.A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: Implications for reproductive success and offspring health. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015; 868: 127–58. doi: 10.1007/978-3-319-18881-2-6.
12. Macklon N.S., Brosens J.J. The human endometrium as a sensor of embryo quality. *Biol. Reprod.* 2014; 91 (4): 98. doi: 10.1095/biolreprod.114.122846.
13. Teklenburg G., Salker M., Molokhia M., Lavery S. et al. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve sensors of embryo quality upon implantation. *PLoS One.* 2010; 5 (4): e10258. doi: 10.1371/journal.pone.0010258.
14. Aghajanova L., Hamilton A.E., Gludice L.C. Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers and transcriptomic. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008; 19 (2): 204–11. doi: 10.1016/j.semdb.2008.01.001.
15. Koot Y.E., Teklenburg G., Salker M.S., Brosens J.J. et al. Molecular aspects of implantation failure. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1822 (12): 1943–50. doi: 10.1016/j.bbdis.2012.12.004.
16. Bazrgar M., Gourabi H., Valojerdi M.R., Yazdi P.E. et al. Self-correction of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013; 22 (17): 2449–56. doi: 10.1089/scd.2013.0053.
17. Vanneste E., Voet T., Le Caignec C., Ampe M. et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat. Med.* 2009; 15 (5): 577–83. doi: 10.1038/nm.1924.
18. Teklenburg G., Salker M., Heijnen C., Macklon N.S. et al. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: natural embryo selection. *Mol. Hum. Reprod.* 2010; 16 (12): 885–95. doi: 10.1093/molehr/gag079.
19. Salker M., Teklenburg G., Molokhia M., Lavery S. et al. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One.* 2010; 5 (4): e10287. doi: 10.1371/journal.pone.001287.
20. Salker M.S., Nautial J., Steel J.H., Webster Z. et al. Disordered IL-33/ST2 activation in decidualizing stromal cells prolong uterine receptivity in women with recurrent pregnancy loss. *PLoS One.* 2012; 7 (12): e52252. doi: 10.1371/journal.pone.0052252.
21. Dey S.K., Lim H., Das S.K., Reese J. et al. Molecular cues to implantation. *Endocrin. Rev.* 2004; 25 (3): 341–73.
22. Horcajadas J.A., Pellicer A., Simon C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum. Reprod. Update.* 2007; 13 (1): 77–86.
23. Zhang S., Kong S., Lu J., Wang Q. et al. Deciphering the molecular basis of uterine receptivity. *Mol. Reprod. Dev.* 2013; 80 (1): 8–21. doi: 10.1002/mrd.22118.
24. Leese H.J., Baumann C.G., Brison D.R., McEvoy T.G. et al. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol. Hum. Reprod.* 2008; 14 (12): 667–72. doi: 10.1093/molehr/gan065.
25. Brosens J.J., Salker M.S., Teklenburg G., Nautial J. et al. Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci. Rep.* 2014; 6 (4): 3894. doi: 10.1038/srep03894.
26. Gardner D.K., Wale P.L. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil. Steril.* 2013; 99 (4): 1062–72. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.004.
27. Serle E., Aplin J.D., Li T.C., Warren M.A. et al. Endometrial differentiation in the peri-implantation phase of women with recurrent miscarriage: a morphological and immunohistochemical study. *Fertil. Steril.* 1994; 62 (5): 989–96.
28. Quenby S., Vince G., Farquharson R., Aplin J. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum. Reprod.* 2002; 17 (8): 1959–63.
29. Weimar C.H., Kavelaars A., Brosens J.J., Gellersen B. et al. Endometrial stromal cells of women with recurrent miscarriage fail to discriminate between high- and low quality human embryos. *PLoS One.* 2012; 7 (7): e41424. doi: 10.1371/journal.pone.0041424.
30. Davidson L.M., Coward K. Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation. *Birth Defects Res. C Embryo Today.* 2016; 108 (1): 19–32. doi: 10.1002/bdrc.21122.
31. Peter Durairaj R.R., Aberkane A., Polanski L., Maruyama Y. et al. Deregulation of the endometrial stromal cell secretome precedes embryo implantation failure. *Mol. Hum. Reprod.* 2017; 23 (7): 478–87. doi: 10.1093/molehr/gax023.

© Коллектив авторов, 2019

Киселевский М.В., Власенко Р.Я., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г.

Прогностическая значимость опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия

Проведенный анализ свидетельствует: несмотря на многочисленные клинические исследования прогностической значимости инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) при различных типах злокачественных новообразований, до настоящего времени нет единой точки зрения по данной проблеме. Наибольший материал накоплен при оценке ТИЛ в качестве фактора прогноза длительности общей и безрецидивной выживаемости и эффективности неoadъювантной терапии больных раком молочной железы. И хотя проведенный в обзорных публикациях метаанализ показал высокий уровень корреляции между интенсивностью инфильтрации опухоли лимфоцитами и выживаемостью больных раком молочной железы, а также с эффективностью неoadъювантной терапии, подобные закономерности отмечены не для всех вариантов этой патологии. Еще больше противоречий возникает при оценке предикторной роли различных субпопуляций лимфоцитов. В частности, в различных исследованиях показана положительная корреляция между процентным содержанием как цитотоксических CD8⁺ ТИЛ, так и супрессорных FOXP3⁺ ТИЛ. Очевидно, по этой причине, согласно рекомендациям German Breast Group, предлагается оценивать инфильтрацию лимфоцитами опухоли с использованием стандартного гистологического окрашивания гематоксилином и эозином без выделения отдельных субпопуляций лимфоцитов. Еще более сложная и неоднозначная трактовка прогностической значимости ТИЛ и их подтипов отмечается при других локализациях злокачественных новообразований, что обусловлено небольшим количеством включенных в исследования пациентов.

Наряду с предиктивной значимостью ТИЛ для химиотерапии опухоль-инфильтрирующие лимфоциты также могут быть прогностическими биомаркерами эффективности иммунотерапии. В частности, новые иммунотерапевтические препараты пембролизумаб, ниволумаб и др. могут эффективно усиливать противоопухолевое действие CD8⁺ ТИЛ. Следовательно, степень выраженности и субпопуляционный состав лимфоидной инфильтрации опухоли могут рассматриваться не только как прогностический фактор течения онкологического заболевания, но также иметь значение для подбора индивидуализированного лечения, в том числе современными иммунотерапевтическими препаратами. Анализ литературы и клинических испытаний был проведен по базам данных Scopus, WebofScience, PubMed, Clinical trial. gov и РИНЦ.

Ключевые слова: опухоль-инфильтрирующие лимфоциты; прогностическая значимость; злокачественные новообразования; обзор

Статья поступила 04.11.2018. Принята в печать 16.11.2018.

Для цитирования: Киселевский М.В., Власенко Р.Я., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Прогностическая значимость опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Иммунология. 2019; 40 (1): 74–83. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11009.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Kiselevskiy M.V., Vlasenko R.Ya., Zabolina T.N., Kadagidze Z.G.

Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes

N.N. Blokhin National Medical Centre of Oncology of the Russian Ministry of Health, 115478, Moscow, Russia

The analysis shows that, despite numerous clinical studies of prognostic significance of infiltrating lymphocytes (TIL) in various types of malignant tumors, there is no single point of view on this problem. The greatest material was accumulated in the evaluation of TIL as a prognostic factor for the duration of General and relapse-free survival and the effectiveness of neoadjuvant therapy in breast cancer patients. Although the meta-analysis carried out in the review publications showed a high level of correlation between the intensity of tumor infiltration by lymphocytes and survival of patients with breast cancer, as well as with the effectiveness of neoadjuvant therapy, similar patterns were noted not for all variants of this pathology. Even more contradictions arise in the evaluation of the predictor role of various lymphocyte subpopulations. In particular, various studies have shown a positive correlation between the percentage of both cytotoxic CD8⁺ TIL and suppressor FOXP3⁺ TIL. Obviously, for this reason, according

Для корреспонденции
Киселевский Михаил
Валентинович – доктор
медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией
клеточного иммунитета
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва, Россия
E-mail: kisele@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

For correspondence
Kiselevskiy Mikhail V. – MD,
Professor, Head of Laboratory
of Cellular Immunity, N.N. Blokhin
National Medical Centre
of Oncology of the Russian Ministry
of Health, Moscow, Russia
E-mail: kisele@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

to the recommendations of the German Breast Group, it is proposed to evaluate the infiltration of tumor lymphocytes using standard histological staining with hematoxylin-eosin without isolation of individual lymphocyte subpopulations. An even more complex and ambiguous interpretation of the prognostic significance of TIL and their subtypes is observed in other localizations of malignant tumors, which is obviously due to the small number of patients included in the study.

Along with the predictive value of TIL for chemotherapy, tumor-infiltrating lymphocytes can also be predictive biomarkers of immunotherapy effectiveness. In particular, new immunotherapy drugs pembrolizumab, nivolumab, etc. can effectively enhance the antitumor effect of CD8⁺ TIL. Therefore, the degree of severity and subpopulation composition of lymphoid infiltration of the tumor can be considered not only as a prognostic factor in the course of cancer, but also be important for the selection of individualized treatment, including modern immunotherapeutic drugs. Literature analysis and clinical trials were conducted on databases Scopus, Web of Science, PubMed, Clinical trial.gov and RISC.

Keywords: tumor filtering lymphocytes; prognostic value; malignant neoplasms; overview

Received 04.11.2018. **Accepted** 16.11.2018.

For citation: Kiselevskiy M.V., Vlasenko R.Ya., Zabolina T.N., Kadagidze Z.G. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunologiya*. 2019; 40 (1): 74–83. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11009. (in Russian)

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ТИЛ) могут являться потенциальными биомаркерами прогноза течения онкологического заболевания и эффективности консервативного лечения. В начале 1922 г. W.C. McCarty и соавт. [1] предложили рассматривать ТИЛ как проявление противоопухолевой активности иммунной системы. В конце 1990-х гг. в серии работ было показано, что инфильтрация опухолей иммунными воспалительными клетками соответствовала прогрессированию опухоли. Позднее была подтверждена двойная роль ТИЛ в микроокружении опухоли при прогрессировании. Так, ТИЛ могут не только подавлять рост опухоли, разрушая трансформированные клетки либо ингибируя их рост, но также способствовать прогрессированию опухоли путем селекции иммунорезистентных клонов или посредством создания в микроокружении опухоли условий, способствующих ее росту [2].

ТИЛ – гетерогенная популяция, включающая в основном Т-лимфоциты и в меньшей степени В-лимфоциты и натуральные киллерные клетки (NK) [3]. Из-за их различных физиологических и патологических эффектов в микроокружении опухоли важное значение имеет состав субпопуляций ТИЛ. С развитием иммуногистохимии исследуется все большее количество подтипов ТИЛ. Так, CD3, биомаркер Т-лимфоцитов, экспрессируется почти на всех Т-лимфоцитах. В соответствии с поверхностными маркерами Т-лимфоциты в основном включают следующие подтипы: CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), CD4⁺ Т-хелперные лимфоциты (Т_ч), CD45RO⁺ Т-клетки памяти (Т_м) и регуляторные клетки FOXP3⁺ (Т_{рег}) и т. д. Корреляцию между ТИЛ и клиническим исходом исследовали при многих злокачественных новообразованиях [4], раке толстой кишки [5], молочной железы [6], меланоме [7], раке яичников [8], поджелудочной железы [9] и т. д. В некоторых исследованиях ТИЛ были признаны более значимым предиктором выживаемости пациентов, чем классифика-

ция TNM. Однако прогностическое значение ТИЛ при ряде типов опухоли остается спорным.

Сообщалось, что высокая плотность CD8⁺ Т-клеток в строме опухоли связана с более длительной общей выживаемостью, тогда как О. Kawai и соавт. показали, что только CD8⁺ Т-клетки в опухолевых гнездах связаны с выживанием пациентов [10]. J. Gos и соавт. сообщили, что уровень обоих типов CD8⁺ Т-клеток имеет прогностическую ценность для пациентов с раком легких [11]. Такие же противоречивые результаты получены при определении в CD3⁺ Т-клеток [12]. В большинстве исследований по сравнению с CD8⁺ и CD3⁺ Т-клетками регуляторные Т-клетки (FOXP3⁺) показали противоположный эффект для прогноза течения заболевания [13]. Иммунологические параметры, включая инфильтрацию опухоли лимфоцитами (ТИЛ), рассматриваются как предикторы ответа на неоадьювантную химиотерапию при раке молочной железы. Эти данные свидетельствуют о том, что иммунная система может влиять на эффективность химиотерапии, открывая возможность новых вариантов лечения посредством модуляции иммунных реакций.

Методические рекомендации для оценки ТИЛ при раке молочной железы

В 2013 г. исследователями, имеющими опыт оценки ТИЛ, был выработан консенсус по оценке ТИЛ. На основе этих обсуждений участники рабочей группы внесли рекомендации по согласованию оценки ТИЛ, которые обобщены в табл. 1. Кроме того, подготовлено учебное пособие «Стандартизированная оценка опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов» ТИЛ при раке молочной железы (РМЖ) для клинической и исследовательской практики или клинических испытаний.

Содержание ТИЛ в строме – это процент стромальных ТИЛ. Знаменателем для определения процента

стромальных ТП является площадь стромальной ткани (т. е. площадь, занимаемая мононуклеарными воспалительными клетками по всей интралимфатической стромальной области), а не количество стромальных клеток. В повседневной практике большинство патологов редко сообщают точные цифры содержания ТП, округляя полученные данные. Процент стромальных ТП является полуколичественным параметром. Например, 80% стромальных ТП означает, что 80% стромальной области занимает плотный моноядерный инфильтрат. Лимфоциты обычно не образуют плотных клеточных агрегатов, поэтому обозначение «100% стромальных ТП» все равно позволит создать пустое пространство ткани между отдельными лимфоцитами. На данном этапе не может быть дана формальная рекомендация о клинически значимом пороге ТП. Консенсус заключается в том, что для клинического использования в настоящее время более важна действующая методология, а не проблемы пороговых значений, которые будут определены после того, как будет создана прочная методология. Лимфоцит-преобладающий РМЖ может использоваться как описательный термин для опухолей, которые содержат «больше лимфоцитов, чем опухолевых клеток». Однако пороговые значения варьируют от 50 до 60% стромальных лимфоцитов.

Технические вопросы оценки ТП

Увеличение микроскопа на самом деле не имеет особого значения, но обычно рекомендуется увеличение $\times 200$ – 400 (окуляр $\times 10$, объектив $\times 20$, $\times 40$). Толщина среза не является критичной, оптимальной считается стандартная толщина – 4–5 мкм. Большинство существующих опытов основано на анализе препаратов, полученных из парафиновых блоков, в то время как оценка ТП на криосрезах недостаточно исследована и не может быть рекомендована для рутинного использования. ТП могут быть оценены с использованием корбиопсий в неoadьювантных режимах, а также хирургических образцов при адьювантных режимах. Учитывая все вышеизложенное, подсчет одного блока для пациента достаточен для неoadьювантного и адьювантного режимов. В некоторых исследованиях оценивалось прогностическое или предиктивное значение ТП, однако необходимо провести дополнительные исследования, прежде чем будут сделаны официальные рекомендации по методологии оценки ТП после неoadьювантного лечения [14]. Первоначально для оценки ТП не рекомендовались тканевые микрочипы (ТМА), поскольку не опубликовано достаточно доказательств того, что ТМА отражают потенциальную гетерогенность ТП. Однако недавно опубликованные результаты, полученные с использованием ТМА, согласуются с другими, используемыми иммуногистохимическими методами исследования подтипов ТП, а не с определением ТП при окраске гематоксилином и эозином [15]. Вероятно, необходимо проведение большего количества исследований, прежде

чем будут предложены окончательные технические методологические рекомендации.

При анализе препаратов должны быть оценены все мононуклеарные клетки, включая лимфоциты и плазматические клетки, а гранулоциты и другие полиморфноядерные лейкоциты следует исключить из подсчета. Количественная оценка других мононуклеарных клеток, таких как дендритные клетки и макрофаги, в настоящее время не рекомендуется, хотя появляется все больше доказательств того, что они могут быть функционально важными.

В нескольких исследованиях для оценки клинической значимости подтипов лимфоцитов использовалась иммуногистохимия. Были протестированы CD45, CD8, CD3 и другие маркеры, экспрессированные на лимфоидных клетках, но, хотя иммуногистохимия может повысить точность оценки, в настоящее время ценность этих маркеров неясна. Рабочая группа ТП в настоящее время не рекомендует использовать иммуногистохимию для обнаружения конкретных субпопуляций, пока не появятся дополнительные доказательства.

ПЦР-диагностика ТП может повысить точность определения субпопуляций лимфоцитов, достигаемую простой морфологией. Однако эффективность этого подхода в настоящее время не доказана. Новые методы, такие как CyTOF [16], все еще находятся в области исследований, и сведения об их потенциале нуждаются в уточнении.

Концепция стромальных и интралимфатических ТП

Первоначальные исследования оценивали стромальные и интралимфатические лимфоциты отдельно. Интралимфатические ТП (иТП) определяются как лимфоциты в опухолевых гнездах, имеющих межклеточные контакты без промежуточной стромы и непосредственно взаимодействующие с опухолевыми клетками, тогда как стромальные ТП (сТП) расположены в строме между опухолевыми клетками и не имеют прямого контакта с последними. Поскольку оба варианта ТП локализованы в области, определяемой как опухолевая ткань, следует подчеркнуть, что обе категории представляют собой истинные ТП. Кроме того, поскольку ТП могут перемещаться в микроокружении живой ткани, это различие может быть несколько искусственным, оно связано со статической ситуацией в гистологических препаратах, которые используются для диагностической оценки.

Первоначальная гипотеза заключалась в том, что лимфоциты, непосредственно взаимодействующие с опухолевыми клетками, могут быть более релевантными и, следовательно, более полезными для диагностической оценки. Хотя эта гипотеза все еще может быть биологически и/или клинически значимой для диагностических целей, на окрашенных гематоксилином и эозином участках большинство современных исследований обнаружили, что сТП являются хорошим и более воспроизводимым параметром. Основные причины: иТП обычно присутствуют в меньших количествах, реже обнаруживаются, они более

неоднородны и их трудно наблюдать на окрашенных гематоксилином и эозином препаратах (т. е. без использования иммуногистохимии или иммунофлуоресценции).

Подсчет иТПЛ не добавляет информации, предоставляемой сТПЛ, поскольку они обычно параллельны сТПЛ. Однако фокусировка на стромальном компоненте (а не на опухоли в целом) имеет явное преимущество, так как плотность и картина роста гнезд карциномы не влияют на подсчет ТПЛ, потому что сТПЛ измеряются только в промежутках между гнездами карциномы. Тем не менее недавно полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на упомянутые выше данные, как стромальные, так и иТПЛ являются факторами прогноза патоморфологического ответа на неoadъювантную химиотерапию препаратами платины [17].

Использование метода иммуногистохимии для определения интратуморальных CD3⁺ или CD8⁺ ТПЛ потенциально может быть применено для выявления сТПЛ. Тем не менее текущая рекомендация рабочей группы ТПЛ состоит в том, чтобы оценивать сТПЛ в качестве основного параметра. Дополнительные параметры, в том числе ТПЛ в перитуморальной области, ТПЛ в инвазивном крае или иТПЛ, могут быть включены в оценку, но требуется подтверждение их потенциальной клинической значимости. Методика подсчета ТПЛ, описанная С. Denkert и др. в 2010 г., впоследствии использовалась в большинстве опубликованных исследований, тем самым предоставляя достаточные данные для начального этапа разработки единой методологии. Дискуссии среди патологов, применяющих этот подход с 2010 г., слегка изменили первоначальную версию. Альтернативная оценка ТПЛ, конечно же, не отменяет ранее опубликованные результаты, использующие другие методы оценки ТПЛ, но обеспечивает основу для будущей стандартизации. Используя рекомендации С. Denkert и соавт., сТПЛ следует оценивать в процентах от стромальных областей, а области, занятые опухолевыми клетками, не должны включаться в общую оценочную площадь поверхности [18]. Это важный момент, потому что в противном случае размер гнезд эпителиальных клеток, а также картина роста опухоли могут влиять на значение сТПЛ. Например, оценка 50% сТПЛ означает, что 50% площади стромальной поверхности заняты ТПЛ.

Клинические исследования прогностической значимости ТПЛ

В ретроспективных исследованиях, проведенных под эгидой German Breast Group, оценивали прогностическую роль ТПЛ после окончания клинического испытания с использованием окрашенных гематоксилином и эозином препаратов, которые были подготовлены в рамках трансляционных исследований. Количество сТПЛ определяли на участках кор-биопсии, полученных до начала неoadъювантной химиотерапии. ТПЛ оценивали с использованием руководящих принципов Международной рабочей группы ТПЛ [19]. Стромальные ТПЛ измеряли как процент иммунных клеток в строме ткани опухоли, которые расценивались как монону-

клеарный иммунологический инфильтрат. Кроме того, использовали 3 категории инфильтрации: низкую (ТПЛ 0–10%), промежуточную (ТПЛ 11–59%) и высокую (ТПЛ 60–100%). Число иТПЛ коррелировало с количеством стромальных ТПЛ, однако концентрации иТПЛ были более низкими.

Рак молочной железы

Наибольшее количество клинических исследований прогностической значимости ТПЛ посвящено раку молочной железы.

Конечными точками были наличие подтвержденного ответа, безрецидивная и общая выживаемость. Проведенный метаанализ был основан на 6 клинических испытаниях, включавших 9125 пациентов, причем у 3771 пациента с первичным РМЖ была проведена предварительная кор-биопсия для оценки ТПЛ. Из них у 1366 (37%) были HER2-негативные опухоли (HER2-), у 906 (25%) – тройные негативные опухоли (TNBC) и у 1379 (38%) были HER2-положительными (HER2+). У 1677 (44%) пациентов опухоли имели низкий уровень ТПЛ, у 1369 (36%) – промежуточное содержание ТПЛ, а у 725 (19%) больных опухоли содержали высокие концентрации ТПЛ. Процент опухолей с высоким уровнем ТПЛ был выше у больных с TNBC – 30 у 273 из 906 и 19 – у 262 из 1379 больных HER2+ РМЖ, чем в опухолях с HER2 – 13 у 172 из 1366. Повышенная концентрация ТПЛ была предиктором ответа на неoadъювантную химиотерапию: полный ответ был достигнут у 328 (20%) больных из 1677 с опухолями, имеющими низкий уровень ТПЛ, у 369 (27%) больных из 1369 с опухолями, имеющими промежуточный уровень ТПЛ, и у 317 (44%) больных из 725 с опухолями, имеющими высокий уровень ТПЛ. Увеличение концентрации ТПЛ коррелировало с полным ответом при всех подтипах РМЖ, когда ТПЛ оценивались как категориальная или непрерывная переменная. У пациентов с люминальным-HER2- подтипом, был достигнут полный ответ у 45 (6%) из 759 пациентов с низким уровнем ТПЛ, у 48 (11%) из 435 с промежуточными уровнем ТПЛ и у 49 (28%) 172 с высоким уровнем ТПЛ. У пациентов с HER2+ подтипом полный ответ был достигнут у 194 (32%) из 605 пациентов с низким уровнем ТПЛ, у 198 (39%) из 512 с промежуточным уровнем ТПЛ и у 127 (48%) из 262 с высоким уровнем ТПЛ. Полный ответ был достигнут у 80 (31%) из 260 пациентов с низким уровнем ТПЛ, у 117 (31%) из 373 с промежуточным уровнем ТПЛ и у 136 (50%) из 273 с высоким уровнем ТПЛ. Проведенный авторами регрессионный анализ уровня инфильтрации опухоли лимфоцитами и полного ответа в группах TNBC, HER2+ РМЖ и люминальный-HER2- РМЖ показал, что ассоциация между иммунологическими инфильтратами и ответом на химиотерапию аналогична в рассматриваемых группах и не зависит от варианта РМЖ [20].

В другом исследовании ТПЛ как прогностический маркер безрецидивной и общей выживаемости был оценен у 2570 пациентов в 5 группах клинических испыта-

ний [21]. Среднее наблюдение за общей выживаемостью составило 62,8 мес, а медиана наблюдения за безрецидивной выживаемостью – 63,3 мес. Было установлено, что пациенты с TNBC и высокой концентрацией ТПЛ имели значительно более продолжительную безрецидивную и общую выживаемость, чем пациенты с TNBC и низкими концентрациями ТПЛ. Высокие концентрации ТПЛ у пациентов с HER2+ РМЖ коррелировали с более длительным безрецидивным периодом по сравнению с пациентами с HER2+ РМЖ и низкими концентрациями ТПЛ. Однако не обнаружено достоверной разницы в общей выживаемости в этих двух подгруппах. Напротив, у пациентов с люминальным-HER2– РМЖ концентрации ТПЛ не были достоверно связаны с безрецидивной выживаемостью, а низкая концентрация ТПЛ коррелировала с более длительной общей выживаемостью, чем высокая концентрация ТПЛ. Связь между концентрацией ТПЛ и выживаемостью была аналогичной при использовании одно- и многофакторного анализа для всех подтипов РМЖ. Однако при включении в многофакторный анализ показателя полного ответа концентрации ТПЛ уже не были достоверно связаны с безрецидивной выживаемостью у всех пациентов или с общей выживаемостью у пациентов с TNBC и с HER2+ РМЖ. Анализ выживаемости с использованием модели Каплана–Майера, включивший 986 пациенток с HER2+ РМЖ и 832 пациентки с люминальным-HER2– РМЖ показал, что высокие концентрации ТПЛ были положительным прогностическим фактором безрецидивной выживаемости в подгруппе TNBC и HER2+. Напротив, в подгруппе люминального-HER2– РМЖ низкие концентрации ТПЛ были положительным прогностическим фактором безрецидивной выживаемости. Общая выживаемость также не зависела от степени инфильтрации опухоли лимфоцитами. Полный ответ в подгруппах TNBC и люминальный-HER2– РМЖ коррелировал с хорошим прогнозом независимо от концентрации ТПЛ. Пациенты с TNBC без полного ответа имели аналогичный прогноз во всех трех группах ТПЛ; напротив, у пациентов с люминальным-HER2– РМЖ без полного ответа прогноз был лучше при низком уровне ТПЛ, чем при высоких или промежуточных концентрациях ТПЛ. Проведенный дополнительно post-hoc-анализ выживаемости на основе молекулярных подтипов и клинико-патологических параметров показал, что высокие концентрации ТПЛ были связаны с более длинными периодом безрецидивной и общей выживаемости, чем низкие уровни ТПЛ в подгруппах TNBC и HER2+ РМЖ. В отличие от этого эффекты были неоднозначными как для безрецидивной, так и для общей выживаемости у пациентов с люминальным-HER2– РМЖ. Для TNBC присутствие большинства типов иммунных клеток, включая различные типы Т-клеток, естественных киллерных клеток, В-клеток, моноцитов и дендритных клеток достоверно коррелировало с хорошим прогнозом общей выживаемости. Напротив, при люминальном-HER2– РМЖ большинство маркеров Т-клеток не были связаны с общей выживаемостью, а дендритные миелоидные клетки и В-клетки коррелировали с лучшим прогнозом, хотя

присутствие моноцитов или макрофагов было связано с плохим прогнозом. Таким образом, прогностическая значимость ТПЛ может существенно зависеть от их субпопуляционного состава и, соответственно, про- или противоопухолевой направленности иммунного ответа.

При объединении 6 рандомизированных исследований неoadьювантной химиотерапии у больных РМЖ было установлено, что концентрации ТПЛ при всех подтипах заболевания имеют высокую корреляцию с полным ответом, но взаимосвязь содержания ТПЛ и безрецидивной и общей выживаемости различна в подгруппах пациентов с HER2+ РМЖ или TNBC (положительная корреляция для обоих подтипов) и люминальным-HER2– РМЖ (отрицательная корреляция). Для прогноза ответа на неoadьювантную терапию может быть использована положительная связь концентрации ТПЛ с полным ответом. Этот эффект, за некоторым исключением, наблюдался в большинстве подгрупп, определяемых стандартными клинико-патологическими параметрами. В логистике регрессионного анализа на каждые 10% увеличения концентрации ТПЛ наблюдалось увеличение шансов полного ответа. В этом исследовании авторы сосредоточились на сТПЛ, так как это локализация ТПЛ преобладала при РМЖ. Число и ТПЛ коррелирует с количеством сТПЛ, но обычно имеет значительно меньшую плотность и поэтому менее подходит для биомаркера. Хотя ассоциация ТПЛ с ответом на неoadьювантную химиотерапию была сходной по подтипам РМЖ, отмечены значительные различия между подтипами для конечных точек выживаемости. Так, для TNBC и HER2+ РМЖ увеличение количества ТПЛ было связано с более продолжительной безрецидивной выживаемостью, чем при низких концентрациях ТПЛ, для TNBC увеличение ТПЛ было связано с повышением общей выживаемости. В многофакторном анализе прогностическая роль ТПЛ в этих подтипах оставалась значительной с учетом базовых параметров. При люминальных-HER2– опухолях ТПЛ не имели прогностической значимости для безрецидивной выживаемости. Примечательно, что для общей выживаемости в этом подтипе наблюдался лучший прогноз, связанный с низкими концентрациями ТПЛ. Таким образом, влияние ТПЛ на общую выживаемость имело противоположный эффект для люминальных опухолей по сравнению с TNBC и HER2+ РМЖ. Маловероятно, что различный эффект ТПЛ на выживаемость при TNBC и люминальном РМЖ происходит из-за различий в реакции на химиотерапию, так как полный ответ увеличивался с повышением концентрации ТПЛ во всех подтипах. Одно из возможных объяснений различий между люминальными опухолями и TNBC может быть связано с неодинаковыми типами инфильтрирующих иммунных клеток. Так, при TNBC, подтипы иммунных клеток, связанные с улучшением выживаемости, включают В-клетки, Т-клетки и макрофаги. Напротив, при люминальном-HER2– РМЖ наличие Т-клеток не было прогностически значимым для выживаемости, и единственными типами клеток, связанных с улучшенным прогнозом, были В-клетки и миелоидные дендритные

клетки, хотя наличие макрофагов в опухоли ассоциировано с уменьшением выживаемости. Это говорит о различиях в клеточном составе и прогностическом эффекте иммунных клеток при TNBC по сравнению с люминально-HER2–РМЖ. Опубликованы различные подходы к анализу фенотипов иммунных клеток в наборах данных злокачественных опухолей [22].

Для автоматизации подсчета ТИЛ используют МСР-счетчик, измеряющий абсолютное содержание подтипов иммунных клеток, что можно использовать для анализа опухолей с низким количеством иммунных клеток, таких как РМЖ. Метод CIBERSORT [23] фокусируется на относительном количественном определении подтипов иммунных клеток и менее подходит для опухолей с низким содержанием ТИЛ. Тем не менее предыдущие исследования с использованием метода CIBERSORT, идентифицировали различные субпопуляции иммунных клеток при РМЖ [24].

Исследования последних десятилетий продемонстрировали взаимосвязь между наличием определенных субпопуляций иммунных клеток и клиническим ответом у пациентов с различными солидными опухолями [25]. Кроме того, накопление данных свидетельствует о том, что адаптивный иммунитет, опосредуемый Т- и В-лимфоцитами, активно участвует в контроле над опухолевым ростом. Так, было установлено, что выраженная инфильтрация опухоли у больных РМЖ цитотоксическими CD8⁺ Т-клетками коррелировала с выживаемостью пациентов [26] и ответом на химиотерапию [27]. Присутствие CD4⁺ регуляторных Т-клеток (Трег) было связано как с хорошим, так и с плохим ответом [28]. Из других субпопуляций CD4⁺ Т-клеток, Th1-лимфоциты (основной клеточный источник интерферона- γ) были связаны с благоприятными клиническими исходами [29], тогда как Th2-клетки свидетельствовали о прогрессировании опухоли [30]. Th17-клетки, продуцирующие провоспалительные цитокины семейства интерлейкина-17, по-видимому, имеют неоднозначную прогностическую значимость [18]. Присутствие фолликулярных CD4⁺-хелперов, как было показано недавно, положительно связано с результатом как адьювантной, так и неoadьювантной терапии [31]. Точная роль В-клеток, инфильтрирующих опухоль, в настоящее время остается спорной [32].

Цитотоксические методы лечения, такие как химио- и лучевая терапия, иногда могут действовать как триггеры иммунной системы, инициируя противоопухолевый иммунный ответ, направленный на более широкий спектр антигенов. Это может обеспечить более высокую вероятность контроля над гетерогенной клеточной популяцией в первичных опухолях и в возникающих метастазах [33]. Эта гипотеза подтверждается исследованиями, показывающими, что степень инфильтрации лимфоцитов может быть предикторным фактором ответа на неoadьювантную терапию и прогностическим маркером безрецидивной и общей выживаемости [34]. В большинстве исследований оценивали не иТИЛ, а сТИЛ, поскольку их определение демонстрирует более воспроизводимый результат и позволяет провести срав-

нение между исследованиями. Некоторые исследования сфокусированы на ТИЛ с использованием иммуногистохимии, в то время как другие оценивали молекулярные маркеры с использованием иммуногистохимии и анализ экспрессии генов.

Рак легкого

Метаанализ, объединяющий 29 исследований и 8600 больных раком легкого (РЛ), подтвердил, что высокая плотность ТИЛ связана с благоприятной безрецидивной, а не с общей выживаемостью. Анализ подгруппы проводился по субпопуляциям ТИЛ, включая CD8⁺, CD3⁺, CD4⁺ и FOXP3⁺ Т-клетки и показал лучшую общую выживаемость у пациентов с высоким уровнем инфильтрации как стромальных, так и интратуморальных CD8⁺ Т-клеток. При этом, как и при РМЖ, большее прогностическое значение имели сТИЛ. Однако высокую плотность инфильтрации FOXP3⁺ Т-клетками можно считать отрицательным прогностическим фактором. Эти результаты были интерпретированы следующим образом: различные подтипы ТИЛ и сайты их распределения связаны с исходом заболевания, но оценка популяции ТИЛ в целом не показала существенных различий в выживаемости.

Высокий уровень инфильтрации CD8⁺ и CD3⁺ Т-клетками в опухоли у пациентов с РЛ расценивается как положительный прогноз, тогда как высокая плотность инфильтрации FOXP3⁺ Т-клетками может быть признана отрицательным прогностическим фактором. Дальнейшие перспективные многоцентровые исследования с большим объемом выборки необходимы для тестирования наиболее перспективной комбинации ТИЛ прогноза при РЛ [35].

Колоректальный рак

В некоторых исследованиях предполагалось, что ТИЛ, такие как CD8⁺ и FoxP3⁺ Т-клетки, могут быть связаны с прогнозом лечения при колоректальном раке. В частности, исследовали влияние ТИЛ на эффективность предоперационной лучевой терапии и выживаемость у 237 пациентов с местнораспространенным раком прямой кишки. Плотность ТИЛ (CD8⁺ и FoxP3⁺) в интраэпителиальных и стромальных компартаментах оценивали в хирургических образцах и биопсиях. Первичная конечная точка заключалась в оценке влияния инфильтрации ТИЛ опухоли или опухолевого узла после предоперационной лучевой терапии на выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость. Вторичными конечными точками были влияние схемы фракционирования дозы лучевой терапии на ТИЛ. При проведении однофакторного анализа установлено, что высокий уровень плотности FoxP3⁺ ТИЛ после лучевой терапии достоверно коррелировал с лучшей выживаемостью без прогрессирования ($p = 0,007$). При многовариантном анализе показано, что снижение отношения CD8⁺/FoxP3⁺ и ТИЛ после лучевой терапии коррелировало с лучшей безрецидивной и общей выживаемостью ($p = 0,049$ и $p = 0,024$ соответ-

ственно). Схема фракционирования дозы значительно влияла на соотношение $CD8^+/FoxP3^+$ после лечения. На основании полученных данных авторы пришли к заключению, что у пациентов со значительным снижением отношения $CD8^+/FoxP3^+$ после лучевой терапии отмечена более высокая общая выживаемость [36].

Рак яичников

К настоящему времени накопилось достаточно данных, свидетельствующих о том, что рак яичников (РЯ) является иммуногенным онкологическим заболеванием, которое может быть распознано иммунной системой хозяина. Поэтому в последние годы была проведена большая работа по выявлению и характеристике ТИЛ при РЯ [37]. Первое сообщение о влиянии ТИЛ на выживаемость при РЯ было сделано Ма еще в 1991 г. После этого был опубликован ряд работ, оценивающих прогностическую ценность ТИЛ при этой патологии. Так, L. Zhang и соавт. провели анализ 186 образцов опухоли больных прогрессирующим РЯ и обнаружили, что наличие интрамуральных $CD3^+$ ТИЛ соответствовало лучшей выживаемости [38]. Однако исследование E. Sato и соавт. не смогло зафиксировать преимуществ в выживаемости больных РЯ с $CD3^+$ ТИЛ. Эти авторы продемонстрировали, что единственным подтипом, связанным с благоприятным прогнозом, являются интраэпителиальные $CD8^+$ ТИЛ [39]. Расхождение в результатах показывает, что прогностическое значение ТИЛ при РЯ остается спорным. J. Li и соавт. проанализировали 21 клиническое исследование прогностической значимости ТИЛ, охватывающее 2903 больных РЯ [40]. Авторы оценивали прогностическую значимость различных подтипов ТИЛ. Проведенный анализ установил, что высокая плотность интраэпителиальных $CD3^+$, $CD8^+$ или $CD103^+$ ТИЛ указывает на лучшую выживаемость, а наличие только $FoxP3^+$ ТИЛ (Трег) и отношение $CD8^+/FoxP3^+$ и $CD8^+/CD4^+$ не связано с прогнозом. Прогностическая роль $FoxP3^+$ ТИЛ (Трег) в разных исследованиях оценивалась неоднозначно. Так, одни исследования показали, что инфильтрация Трег была связана с уменьшением общей выживаемости при РЯ [41], а другие авторы не выявили такой ассоциации [42] или установили положительный эффект инфильтрации Трег на выживаемость пациентов с РЯ [43]. Эти расхождения отчасти могут быть объяснены различиями в исследуемой популяции, методом обработки и вариантов гистологических исследований образцов опухоли. Кроме того, разница в выборе маркеров Трег в каждом исследовании также может способствовать противоречивости результатов. Причина в том, что экспрессия $FoxP3$ клетками Трег может быть нестабильной и в дифференцировке лимфоцитов существует большая степень пластичности [44].

Таким образом, ТИЛ имеют прогностическое значение при РЯ, которое зависит от содержания различных подтипов ТИЛ. Следует отметить, что к настоящему времени опубликовано более 1200 экспериментальных и клиниче-

ских исследований, а также обзорных статей и комментариев, но однозначно оценить клиническую значимость ТИЛ как прогностического фактора еще предстоит, и для этого необходимо проведение хорошо спланированных рандомизированных контролируемых испытаний.

Рак головы и шеи

Согласно проведенным исследованиям высокая инфильтрация $CD3^+$ ТИЛ коррелировала с благоприятным прогнозом как для ВПЧ-отрицательных, так и для ВПЧ-положительных опухолей головы и шеи. Это соответствует гипотезе о том, что иммунные клетки в микроуровне опухоли имеют большое значение для клинических исходов, а также результатам определения других видов рака [45].

В исследованиях ТИЛ при плоскоклеточном раке головы и шеи в основном определялась прогностическая ценность $CD8^+$ ТИЛ. Авторы предполагали, что $CD8^+$ – маркер цитотоксических Т-лимфоцитов, которые непосредственно нацелены на опухолевые клетки, более надежен, чем $CD3$. Действительно, ряд исследований, которые оценивали прогностическую ценность $CD8^+$ ТИЛ, показали лучший результат у пациентов с высокой инфильтрацией $CD8^+$ Т-клеток [46]. Метаанализ также показал, что высокая инфильтрация $CD4^+$ ТИЛ является благоприятным прогностическим биомаркером результатов лечения этой категории пациентов. Однако большинство исследований прогностической роли $CD4^+$ лимфоцитов не приводят должного анализа статистической значимости. Другие исследования показали, что количество $FoxP3^+$ ТИЛ может просто отражать общее количество Т-клеток, присутствующих в опухолевом эпителии, и влияние $CD8^+$ Т-клеток превышает иммунодепрессивный эффект Трег [47]. Поэтому предлагается оценивать не только содержание Трег, но и соотношение $CD8^+/FoxP3$. Высокое соотношение, которое отражает относительное истощение Трег, является потенциальным биомаркером благоприятного клинического исхода для разных типов опухолей. У больных плоскоклеточным раком головы и шеи только 1 исследование оценило это соотношение, продемонстрировав многообещающие результаты. Однако необходимы дополнительные исследования для подтверждения прогностического значения отношения $CD8^+/FoxP3$ у таких больных. Учитывая неоднозначную роль $CD4^+$ -лимфоцитов в микроокружении опухоли и небольшое количество этого маркера, можно заключить, что прогностическая роль $CD4$ остается сомнительной. Мета-анализ неожиданно показывает, что высокая инфильтрация опухоли $FoxP3^+$ -лимфоцитами предсказывает лучший клинический результат у пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи. Хотя есть сведения, что при колоректальном раке и раке пищевода, присутствие иммуносупрессивных Т-клеток в микроокружении опухоли было связано с лучшими клиническими исходами [48]. Возможное объяснение этого явления – Трег играют роль в подавлении продолжающегося неэффективного воспалительного ответа, который связан с прогрессированием опухоли и воспалительным цитокином, продуцирующим иммунные клетки, такими как макрофаги и дендритные клетки.

Метаанализ подтвердил прогностическую роль инфильтрации CD3⁺ Т-клеток и Т-клеток CD8⁺ при плоскоклеточном раке головы и шеи. Высокие показатели CD3- и CD8⁺-лимфоцитов предсказывали лучший клинический результат. Тем не менее для включения различных маркеров Т-клеток в качестве прогностических биомаркеров в клиническую практику необходимо их исследование с использованием современных методов в однородных когортах по отношению к гистологическому варианту опухоли, стадии заболевания и терапии.

Рак пищевода

Несколько исследований подтвердили, что ТИЛ могут быть одним из потенциальных прогностических биомаркеров для пациентов с раком пищевода, однако прогностическая роль ТИЛ противоречива [49]. В. Zhang и соавт. сообщили, что пациенты с высоким уровнем CD8⁺ ТИЛ имеют лучшую общую выживаемость [50], тогда как Wangetal и соавт. обнаружили, что выживание пациентов не зависит от уровня CD8⁺ ТИЛ. F. Noble и др. считают, что высокий уровень FoxP3⁺ ТИЛ был связан с лучшей выживаемостью [51]. Ввиду этих противоречивых результатов был проведен метаанализ для оценки прогностической роли ТИЛ при раке пищевода, включивший 2909 пациентов в 22 исследованиях. Анализ подтвердил, что высокий уровень ТИЛ был связан с лучшей выживаемостью, учитывая, что каждый подтип ТИЛ играет разную роль в развитии рака пищевода. Так, установлено, что высокий уровень CD8⁺ ТИЛ коррелирует с лучшей выживаемостью больных раком пищевода. Некоторые исследования показали, что высокий уровень Трег является неблагоприятным прогностическим фактором при нескольких видах опухолей [52]. Однако у больных раком пищевода высокий уровень FoxP3⁺ ТИЛ был связан с лучшей безрецидивной, но не с общей выживаемостью. Возможно, потому, что иммуносупрессия FoxP3⁺ ТИЛ является механизмом отрицательной обратной связи, в котором высокий уровень FoxP3⁺ ТИЛ часто сопровождается высоким уровнем CD8⁺ ТИЛ [53]. Роль CD4⁺ ТИЛ неоднозначна, эта субпопуляция лимфоцитов может не только индуцировать противоопухолевую активность, но и способствовать росту опухоли, что согласуется с неоднозначной прогностической значимостью CD4⁺ ТИЛ. CD45RO⁺ является важным маркером Т-клеток памяти. CD45RO⁺ Т-клетки способны проявлять эффективный противоопухолевый иммунный ответ после повторной стимуляции опухоль-ассоциированными антигенами [54]. Однако CD45RO⁺ ТИЛ не связаны с выживаемостью пациентов, в то время как высокий уровень CD57⁺ ТИЛ – натуральных киллеров коррелирует с лучшей выживаемостью больных раком пищевода.

Меланома

Данные последних исследований говорят о более высоком содержании FoxP3⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови больных меланомой III–IV стадии заболевания по сравнению со здоровыми донорами. Содержа-

ние Foxp3⁺ Т-лимфоцитов в лимфоидном инфильтрате опухоли у пациентов с меланомой достоверно выше, чем в периферической крови, а перитуморальная экспрессия Foxp3⁺ Т-лимфоцитов выше, чем интратуморальная [55]. По данным еще одного исследования высокий уровень Foxp3⁺ Т-лимфоцитов в лимфоидном инфильтрате опухоли коррелировал с низкой безрецидивной и общей выживаемостью больных и являлся независимым прогностическим фактором [56]. По данным другого исследования, проведенного с помощью проточной цитофлуориметрии, повышение количества Foxp3⁺ Т-лимфоцитов в лимфоидном инфильтрате меланомы коррелировало с прогрессированием заболевания [57]. В то же время исследование А. KnoI и соавт. не показало существенных различий содержания Foxp3⁺ Т-лимфоцитов у пациентов с метастазами и без таковых в сторожевом лимфатическом узле [58]. Однако высокое содержание Foxp3⁺ Т-лимфоцитов в инфильтрате опухоли больных с III стадией меланомы коррелировало с уменьшением времени безрецидивной, но не с общей выживаемостью больных. В то же время исследование А. Ladanyi и соавт. не выявило корреляционной связи инфильтрации опухоли Foxp3⁺ Т-лимфоцитами с толщиной опухоли и выживаемостью больных меланомой [59].

Заключение

Таким образом, проведенный анализ свидетельствует о том, что, несмотря на многочисленные клинические исследования прогностической значимости ТИЛ при различных типах злокачественных новообразований, до настоящего времени нет единой точки зрения по данной проблеме. Наибольший материал был накоплен при оценке ТИЛ в качестве фактора прогноза длительности общей и безрецидивной выживаемости и эффективности неoadьювантной терапии больных РМЖ. И хотя проведенный в обзорных публикациях метаанализ показал высокий уровень корреляции между интенсивностью инфильтрации опухоли лимфоцитами и выживаемостью больных РМЖ, а также с эффективностью неoadьювантной терапии, подобные закономерности отмечены не для всех вариантов РМЖ. Еще больше противоречий возникает при оценке предикторной роли различных субпопуляций лимфоцитов. В частности, в различных исследованиях показана положительная корреляция между процентным содержанием как цитотоксических CD8⁺ ТИЛ, так и супрессорных FOXP3⁺ ТИЛ. Очевидно, по этой причине, согласно рекомендациям German Breast Group, предлагается оценивать инфильтрацию лимфоцитами опухоли с использованием стандартного гистологического окрашивания гематоксилином и эозином без выделения отдельных субпопуляций лимфоцитов. Еще более сложная и неоднозначная трактовка прогностической значимости ТИЛ и их подтипов отмечается при других локализациях злокачественных новообразований, что, очевидно, обусловлено небольшим числом включенных в исследования пациентов.

Наряду с предиктивной значимостью ТИЛ для химио- и лучевой терапии опухоль-инфильтрирующие лимфоциты также могут быть прогностическими биомаркерами

эффективности иммунотерапии. В частности, новые иммунотерапевтические препараты пембролизумаб, ниволумаб и др. могут эффективно усиливать противоопухолевое действие CD8⁺ TIL. Следовательно, степень выраженности и субпопуляционный состав лимфоидной

инфильтрации опухоли могут рассматриваться не только как прогностический фактор течения онкологических заболеваний, но также иметь значение для подбора индивидуализированного лечения, в том числе современными иммунотерапевтическими препаратами.

■ Литература/References

1. McCarty W.C. Principles of prognosis in cancer. *JAMA*. 1931; 96: 30–3.
2. Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331: 1565–70.
3. Balch C.M., Riley L.B., Bae Y.J., Salmeron M.A. et al. Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch. Surg.* 1990; 125: 200–5.
4. Al-Shibli K.I., Donnem T., Al-Saad S., Persson M. et al. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 5220–27.
5. Mlecnik B., Tosolini M., Kirilovsky A., Berger A. et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 610–18.
6. Mahmoud S.M., Paish E.C., Powe D.G., Macmillan R.D. et al. Tumor-infiltrating CD8⁺ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin. Oncol.* 2011; 29: 1949–55.
7. Mackensen A., Ferradini L., Carcelain G., Triebel F. et al. Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma. *Cancer Res.* 1993; 53: 3569–73.
8. Zhang L., Conejo-Garcia J.R., Katsaros D., Gimotty P.A. et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 203–13.
9. Fukunaga A., Miyamoto M., Cho Y., Murakami S. et al. CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas.* 2004; 28: e26–31.
10. Kawai O., Ishii G., Kubota K., Murata Y. et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2008; 113: 1387–95.
11. Goc J., Germain C., Vo-Bourgais T.K., Lupo A. et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8⁺ T cells. *Cancer Res.* 2014; 74: 705–15.
12. Kayser G., Schulte-Uentrop L., Siel W., Werner M. et al. Stromal CD4/CD25 positive T-cells are a strong and independent prognostic factor in non-small cell lung cancer patients, especially with adenocarcinomas. *Lung Cancer.* 2012; 76: 445–51.
13. Suzuki K., Kadota K., Sima C.S., Nitadori J. et al. Clinical impact of immune microenvironment in stage I lung adenocarcinoma: tumor interleukin-12 receptor beta2 (IL-12Rbeta2), IL-7R, and stromal FoxP3/CD3 ratio are independent predictors of recurrence. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 490–8.
14. Dieci M.V., Criscitiello C., Goubar A., Viale G. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann. Oncol.* 2014; 25: 611–8.
15. Schalper K.A., Velcheti V., Carvajal D., Wimberly H. et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20: 2773–82.
16. Bendall S.C., Simonds E.F., Qiu P., Amir el-A.D. et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science*. 2011; 332: 687–96.
17. Vinayak S., Gray R.J., Adams S., Jensen K.C. et al. Association of increased tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with immunomodulatory (IM) triple-negative breast cancer (TNBC) subtype and response to neoadjuvant platinum-based therapy in PrECOG105. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32: 15.
18. Denkert C., Loibl S., Noske A., Roller M. et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 105–13.
19. Salgado R., Denkert C., Demaria S., Sirtaine N. et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015; 26: 259–71.
20. Denkert C., von Minckwitz G., Darb-Esfahani S., Lederer B. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018; 19 (1): 40–50.
21. Von Minckwitz G., Schneeweiss A., Loibl S., Salat C. et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 747–56.
22. Iglesia M.D., Parker J.S., Hoadley K.A., Serody J.S. et al. Genomic analysis of immune cell infiltrates across 11 tumor types. *J. Natl. Cancer Inst.* 2016; 108: djw144.
23. Gentles A.J., Newman A.M., Liu C.L., Bratman S.V. et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* 2015; 21: 938–45.
24. Bense R.D., Sotiriou C., Piccart-Gebhart M.J., Haanen J.B. et al. Relevance of tumor-infiltrating immune cell composition and functionality for disease outcome in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2016; 109: djw192.
25. Galon J., Angell H.K., Bedognetti D., Marincola F.M. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity*. 2013; 39 (1): 11–26.
26. Liu S., Foulkes W.D., Leung S., Gao D. et al. Prognostic significance of FOXP3⁺ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res.* 2014; 16: 432.
27. Seo A.N., Lee H.J., Kim E.J., Kim H.J. et al. Tumour-infiltrating CD8⁺ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2013; 109: 2705–13.
28. West N.R., Kost S.E., Martin S.D., Deleeuw R.J. et al. Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2013; 108: 155–62.
29. Gu-Trantien C., Loi S., Garaud S., Equeter C. et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 2873–92.
30. Teschendorff A.E., Gomez S., Arenas A., El-Ashry D. et al. Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. *BMC Cancer.* 2010; 10: 604–23.
31. Qi W., Huang X., Wang J. Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment. *Cell Immunol.* 2013; 285: 18–22.
32. Mahmoud S.M., Lee A.H., Paish E.C., Macmillan R.D. et al. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; 132: 545–53.
33. Almendro V., Kim H.J., Cheng Y.K., Gonen M. et al. Genetic and phenotypic diversity in breast tumor metastases. *Cancer Res.* 2014; 74: 1338–48.

34. Loi S., Sirtaine N., Piette F., Salgado R. et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 860–67.
35. Geng Y., Shao Y., He W., Hu W. et al. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer: a meta-analysis. *Cell Physiol. Biochem.* 2015; 37 (4): 1560–71.
36. Mirjolet C., Charon-Barra C., Ladoire S., Arbez-Gindre F. et al. Tumor lymphocyte immune response to preoperative radiotherapy in locally advanced rectal cancer: The LYMPHOREC study. *Oncoimmunology.* 2017; 7 (3): e1396402.
37. Benedet J.L., Bender H., Jones H. III, Ngan H.Y. et al. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2000; 70: 209–62.
38. Zhang L., Conejo-Garcia J.R., Katsaros D., Gimotty P.A. et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 203–13.
39. Sato E., Olson S.H., Ahn J., Bundy B. et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102: 18 538–43.
40. Li J., Wang J., Chen R., Bai Y. et al. The prognostic value of tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian cancer. *Oncotarget.* 2017; 8 (9): 15621–31.
41. Adams S.F., Levine D.A., Cadungog M.G., Hammond R. et al. Intraepithelial T cells and tumor proliferation: impact on the benefit from surgical cytoreduction in advanced serous ovarian cancer. *Cancer.* 2009; 115: 2891–902.
42. Vermeij R., de Bock G.H., Leffers N., Ten H.K. et al. Tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes as independent prognostic factor in epithelial ovarian cancer with wilms tumor protein 1 overexpression. *J. Immunother.* 2011; 34: 516–23.
43. Leffers N., Gooden M.J., de Jong R.A., Hoogbeem B.N. et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009; 58: 449–59.
44. Zhou L., Chong M.M., Littman D.R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.* 2009; 30: 646–55.
45. Gooden M.J., de Bock G.H., Leffers N., Daemen T. et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br. J. Cancer.* 2011; 105 (1): 93–103.
46. de Ruiter E.J., Ooft M.L., Devriese L.A., Willems S.M. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology.* 2017; 6 (11): e1356148.
47. Park K., Cho K.J., Lee M., Yoon D.H. et al. Importance of FOXP3 in prognosis and its relationship with p16 in tonsillar squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2013; 33 (12): 5667–73.
48. Shang B., Liu Y., Jiang S.J., Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2015; 5: 15179.
49. Vacchelli E., Semeraro M., Enot D.P., Chaba K. et al. Negative prognostic impact of regulatory T cell infiltration in surgically resected esophageal cancer post-radiochemotherapy. *Oncotarget.* 2015; 6: 20 840–50.
50. Zhang G., Liu W.L., Zhang L., Wang J.Y. et al. Involvement of indoleamine 2, 3-dioxygenase in impairing tumor-infiltrating CD8 T-cell functions in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Dev. Immunol.* 2011; 2011: 384726.
51. Noble F., Mellows T., McCormick Matthews L.H., Bateman A.C. et al. Tumour infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in patients with oesophageal adenocarcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 2016; 65: 651–62.
52. Gao Q., Qiu S.J., Fan J., Zhou J. et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 2586–93.
53. Zingg U., Montani M., Frey D.M., Dirnhofer S. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and survival in patients with adenocarcinoma of the oesophagus. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2010; 36: 670–77.
54. Levy Y., Lacabaratz C., Weiss L., Viard J.P. et al. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 997–1007.
55. Ahmadzadeh M., Felipe-Silva A., Heemskerk B., Powell D.J. et al. FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanomas. *Blood.* 2008; 112 (13): 4953–60.
56. Gerber A.L., Müntz A., Schlapbach C., Shafiqi M. et al. High expression of FOXP3 in primary melanoma is associated with tumour progression. *Br. J. Dermatol.* 2014; 170 (1): 103–9.
57. Fujii H., Arakawa A., Kitoh A., Miyara M. et al. Perturbations of both nonregulatory and regulatory FOXP3+ T cells in patients with malignant melanoma. *J. Dermatol.* 2011; 164 (5): 1052–60.
58. Knol A.C., Nguyen J.M., Quéreux G., Brocard A. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ T-cell subpopulations in metastatic melanoma. *Exp. Dermatol.* 2011; 20 (5): 430–34.
59. Ladányi A., Mohos A., Somlai B., Liskay G. et al. FOXP3+ cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma. *Pathol. Oncol. Res.* 2010; 16 (3): 303–9.

© Гудима Г.О., 2019

Гудима Г.О.

Инновации в аллергологии

26–30 мая 2018 г. в Мюнхене (Германия) состоялся XXXVI конгресс Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСИ). В научной программе конгресса широко обсуждались фундаментальные вопросы аллергологии и клинической иммунологии, совершенствование аллерген-специфической иммунотерапии, молекулярная аллергодиагностика, патогенез и современные стратегии терапии бронхиальной астмы, пищевой и лекарственной аллергии, аллергических заболеваний кожи и дыхательных путей, а также актуальные аспекты детской аллергологии, подходы к терапии профессиональных аллергических заболеваний, первичная и неотложная специализированная медицинская помощь при аллергии.

Ежегодный конгресс ЕААСИ является наиболее представительным международным форумом, объединяющим специалистов в области аллергологии и клинической иммунологии. В 2018 г. число участников конгресса приблизилось к 10 тыс. человек. Традиционно в работе конгресса приняла участие представительная делегация Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов (РААКИ) и ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Исполнительным комитетом и программным комитетом ЕААСИ была сформирована обширная многоплановая программа, которая включала научные сессии, дискуссии, образовательные курсы, организационные заседания. Активное участие в работе исполнительного комитета ЕААСИ принимал директор ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России М.Р. Хаитов. В качестве председателя экзаменационного комитета ЕААСИ М.Р. Хаитов принял ежегодный 11-й ЕААСИ/UEMS-экзамен у 64 специалистов из 17 стран Евросоюза (ЕС) (Швейцария, Испания, Германия и т. д.) и 15 стран, не входящих в ЕС (Бразилия, Кувейт, Южная Африка). ЕААСИ/UEMS экзамен стал значимым событием конгресса. В этом году был поставлен рекорд по количеству специалистов, которые зарегистрировались и приняли участие в экзамене. ЕААСИ/UEMS экзамен входит в число основных мероприятий ширококомасштабной образовательной программы ЕААСИ, направленной на стимулирование клиничко-иммунологических и аллергологических научных исследований, совершенствование специализированной медицинской помощи и повышение профессионального уровня специалистов аллергологов-иммунологов.

На конгрессе состоялось заседание Комитета национальных обществ аллергологов и клинических иммунологов (NASC) (представитель РААКИ – Г.О. Гудима). Участников заседания приветствовала президент ЕААСИ Ioana Agache, с отчетным докладом выступила



Президент ЕААСИ Ioana Agache, председатель Комитета национальных обществ ЕААСИ Maria Beatrice Bilo, директор Института иммунологии М.Р. Хаитов и российские участники конгресса на стенде РААКИ

председатель NASC Maria Beatrice Bilo. Обсуждалось расширение международного партнерства в области совершенствования специализированной аллергологической медицинской помощи, повышения уровня подготовки специалистов, гармонизации клинической аллергологической практики. Отмечена важность непрерывного медицинского образования, развития исследований по профилактике и лечению аллергических заболеваний и иммунопатологий. Специальный акцент был сделан на разработке и внедрении клинических руководств, в том числе путем перевода руководств и позиционных документов ЕААСИ и публикации их в журналах национальных аллергологических обществ. В числе перспективных направлений деятельности комитета указано развитие электронных информационных ресурсов на платформе ЕААСИ Media Library, формирование Европейского реестра аллергологических исследований, а также поддержка национальных конгрессов и иных мероприятий по клинической иммунологии и аллергологии путем делегирования лекторов – ведущих европейских специалистов.

Прогресс современной клинической иммунологии и аллергологии в значительной степени определяется результатами фундаментальных научных исследований. На симпозиумах и дискуссионных сессиях были представлены новейшие данные исследований роли базофилов и тучных клеток в патогенезе аллергии, значимости баланса Th2/Th17 в развитии астмы и других аллергических заболеваний, о клеточных и молекулярных механизмах анафилаксии. Участники конгресса обсуждали происхождение и жизненный цикл IgE-продуцирующих клеток, молекулярные механизмы аллергенной сенсибилизации, значимость эпителиев в активации эффекторных клеток, роль цитокинов, адаптивного и врожденного иммунитета в развитии аллергии. Важным направлением клинической иммунологии является им-



Ежегодный EAACI/UEMS-экзамен. Председатель экзаменационного комитета – М.Р. Хаитов

мунотерапия. Ряд специализированных симпозиумов был посвящен иммунологическим и клиническим эффектам аллерген-специфической иммунотерапии, повышению ее эффективности, важности баланса гипераллергенности и иммуногенности иммунотерапевтических вакцинных препаратов. Исследования иммунологии дыхательных путей дали значимый импульс разработке респираторных иммунотропных препаратов и существенно расширили возможности терапевтического воздействия. Фундаментальные исследования внесли весомый вклад в понимание патогенеза инсектной аллергии, наследственного ангионевротического отека, иммунозависимых механизмов инфекционных заболеваний. Также фундаментальные исследования обеспечили разработку инновационных подходов к лечению первичных иммунодефицитов, выработку прогрессивных стратегий иммуномодуляции при аутоиммунных заболеваниях и первичных иммунодефицитах, формулировку новых концепций аллерген-специфической иммунотерапии, создание биопрепаратов для противодействия воспалительным заболеваниям и таргетного воздействия на Th2-иммунный ответ.

Отдельная пленарная сессия была посвящена астме, устойчивой к терапии. При этой форме астмы не наблюдается эозинофилия и не отмечается воспаление. На сессии обсуждались методы выявления биомаркеров для идентификации индивидуальных эндотипов заболевания и перспективные подходы к таргетной терапии резистентной астмы. В докладах были представлены эндотипические характеристики неэозинофильной астмы, неинвазивные методы диагностики резистентной астмы, проблемы и способы лечения этой формы астмы.

Большое внимание в научной программе конгресса было уделено фундаментальным механизмам, лежащим в основе патогенеза иммунопатологий и аллергических заболеваний. На специализированной пленарной сессии анализировались сложные клеточные и молекулярные взаимодействия при аллергическом воспалении кожи. Рассматривалась роль мимикрии и перекрестной реактивности микробных антигенов и аутоантигенов при адаптивном иммунном ответе, охарактеризован липид-специфический иммунный ответ, представлены новые возможности применения прецизионной медицины для лечения заболеваний кожи.

На пленарной сессии «Деревенские дороги к превенции аллергии» был представлен обзор современных результатов исследований так называемого эффекта фермы на развитие аллергических заболеваний, в основе которого лежит наблюдение, что дети, выросшие в деревенских условиях, менее подвержены аллергии, чем дети, которые росли в городских условиях. Среди обсуждавшихся вопросов – микробная экспозиция и употребление деревенского молока как потенциальные медиаторы эффекта фермы, расширение алергологических исследований во взрослом возрасте, возможные иммунологические механизмы этого эффекта. Рассматривалась потенциальная профилактическая роль контакта с микроорганизмами и употребление непереработанного молока в детском возрасте, влияние факторов внешней среды на развитие аллергии в различном возрасте, подходы к воздействию на врожденный иммунитет с целью превенции аллергии.

К числу перспективных стратегий лечения аллергических заболеваний относится пассивная иммунотерапия с использованием блокирующих антител. В пленарных докладах обсуждалось терапевтическое применение аллоантител к фактору VIII, а также использование препаратов IgG4 при пищевой аллергии и сенсибилизации к аллергенам животных.

Предметом пленарных сессий стала роль бактериальной и грибковой микрофлоры в патогенезе аллергии. Обсуждалась роль внешнего микробиома в развитии заболеваний дыхательных путей, иммунологические последствия дисбаланса микрофлоры кишечника, связь грибов *Aspergillus* с нарушением функционирования иммунной системы дыхательных путей. На сессии «Движение по канату между толерантностью и сенсибилизацией» рассматривалась роль бактериальной микрофлоры в развитии сенсибилизации, защиты и толерантности при заболеваниях дыхательных путей, анализировались значимость изменений баланса микробиома кишечника в развитии аллергических заболеваний, влияние окружающей среды и эпигеномных факторов на баланс между чувствительностью и толерантностью.

Самостоятельная пленарная сессия была посвящена оценке клинической пользы применения биомолекул (биопрепаратов) для противодействия развитию воспалительных заболеваний, в том числе аллергии. Доклады на этой сессии были посвящены концепции таргетного воздействия на воспаление с помощью регуляторных противовоспалительных биомолекул, анализу роли интерлейкина-4 в регуляции иммунной толерантности и применение блокаторов этого цитокина в терапии аллергических заболеваний.

На симпозиумах, посвященных актуальным проблемам клинической иммунологии и алергологии, рассматривалось применение прецизионной медицины в терапии аллергических заболеваний, эпидемиология, факторы риска, диагностика и клинические характеристики лекарственной гиперчувствительности, фун-

даментальные и клинические аспекты атопического и контактного дерматита, новые подходы к превенции заболеваний дыхательных путей. Анализировались клинические примеры редких иммунодефицитов, новые данные о патогенезе крапивницы и применение анти-IgE-препаратов для ее лечения. Обсуждались новые горизонты аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ), роль интерлейкин-4- и интерлейкин-13-зависимых путей в лечении аллергических заболеваний, инновационные методы таргетного воздействия на иммунный ответ, а также анализ больших данных в аллергологии.

Аллергодиагностика играет ключевую роль в выборе эффективной стратегии лечения аллергических заболеваний, а также вносит важный вклад в фундаментальные аллергологические исследования. В то же время фундаментальные научные разработки способствуют постоянному совершенствованию аллергодиагностики. В научную программу конгресса были включены многочисленные симпозиумы и практические курсы, посвященные различным аспектам современной аллергодиагностики. Обсуждались молекулярные основы лабораторных тестов *in vitro*, применение биомаркеров в диагностике аллергии, новейшие результаты применения методов молекулярной аллергологии и клеточного тестирования в аллергодиагностике. На дискуссионных заседаниях специалисты подробно анализировали потенциал и ограничения ключевых лабораторных тестов, применяемых в аллергодиагностике, обсуждали использование подходов геномики, протеомики и иммуногенетики в диагностике аллергических заболеваний, а также пути повышения эффективности молекулярной аллергодиагностики. На школах для практических врачей были представлены новые методы молекулярной диагностики и варианты их клинического применения, данные изучения молекулярных профилей аллергической сенсibilизации. Рассматривались практические подходы к диагностике гиперчувствительности к нестероидным противовоспалительным лекарственным препаратам, особенности диагностики астмы, лекарственной и пищевой аллергии, атопического дерматита, аллергии к домашним животным. Кроме того, рассматривались новые достижения молекулярной аллергологии и молекулярной диагностики в идентификации и исследовании пищевой аллергии, аллергических заболеваний кожи, аллергии к яду насекомых, лекарственной гиперчувствительности, а также применение приемов молекулярной диагностики в сравнительной аллергологии.

АСИТ традиционно является одним из основных направлений научной программы конгресса. Актуальные вопросы АСИТ обсуждались на симпозиальных заседаниях, рабочих совещаниях, дискуссионных площадках, постерных сессиях и курсах усовершенствования специалистов-аллергологов. Заседания были посвящены анализу современного состояния АСИТ, фундаментальным основам метода, иммунному ответу на вве-



Заседание Комитета национальных обществ аллергологов и клинических иммунологов (NASC). Выступает председатель NASC Maria Beatrice Bilo

дение препаратов лечебных аллергенов, особенностям применения АСИТ в клинической практике. Участники конгресса обсуждали применение компонентной аллергодиагностики при назначении АСИТ, возможности АСИТ для контроля аллергического ринита, бронхиальной астмы, пищевой аллергии, аллергических заболеваний кожи, связь характеристик аллергенов с потенциальной терапевтической эффективностью. Большое внимание уделялось фундаментальным основам АСИТ, современным тенденциям в разработке вакцинных препаратов для иммунотерапии, инновационным подходам в дизайне клинических испытаний в области АСИТ, объективной оценке клинической эффективности АСИТ и путям повышения ее эффективности и безопасности.

Существенная часть программы конгресса была посвящена аллергическим заболеваниям дыхательных путей. Значительная доля в структуре этих заболеваний принадлежит бронхиальной астме. Участники конгресса обсуждали широкий спектр вопросов, связанных с эпидемиологией и диагностикой бронхиальной астмы, ее фенотипы, особенности клинического течения. Отдельным предметом анализа стала детская астма: рассматривались исследовательские разработки и стратегии лечения астмы и ринита в детском возрасте, возможности применения прецизионной медицины при детской астме.

На симпозиумах были представлены результаты фундаментальных научных исследований участия иммунорегуляторных молекул в патогенезе астмы и других аллергических заболеваний дыхательных путей, роли врожденного иммунитета в патогенезе астмы, особенностей функционирования стволовых клеток при хронических воспалительных заболеваниях. Важный вклад в развитие диагностики и лечения бронхиальной астмы вносят исследования ее патогенеза, генетики, эпигенетики, а также идентификация биомаркеров заболевания. Рассматривалось применение достижений геномики и протеомики, а также данных исследований иммунологии дыхательных путей для совершенствования стратегий те-

рапии астмы и других респираторных аллергических заболеваний, в том числе таргетной терапии. Активно обсуждались перспективы и ограничения применения иммунотропных биопрепаратов, воздействующих на Th2-иммунный ответ, а также новые подходы к превенции тяжелых обострений астмы. На образовательных курсах для практических врачей рассматривались фено- и эндотипы астмы, клинические характеристики астмы и сопутствующих заболеваний, стратегии терапии и ведения пациентов с астмой, рекомендации по применению АСИТ в лечении астмы.

Большое внимание на конгрессе было уделено пищевой аллергии, в том числе применению достижений молекулярной аллергологии в пищевой аллергии, особенностям иммунного распознавания при пищевой аллергии, особенностям ведения пациентов с пищевой аллергией и эозинофильным эзофагитом, а также роли пробиотиков и микроэлементов в превенции пищевой аллергии.

Всесторонний анализ патогенетических механизмов и стратегий лечения атопического дерматита и других заболеваний кожи также был отражен в научной программе конгресса. На пленарных сессиях и симпозиумах обсуждались стратегии лечения и ведения пациентов с атопическим дерматитом, применение биопрепаратов при данном заболевании. Дискуссионные сессии были посвящены многообразию и дифференциальной диагностике кожных заболеваний, влиянию микробиома на развитие аллергических заболеваний кожи, тяжелым кожным реакциям на медикаменты. Также рассматривались фундаментальные механизмы и способы лечения наследственного ангионевротического отека, возможный вклад атопического дерматита в индукцию пищевой аллергии, лекарственная и кожная аллергия в детском и подростковом возрасте. Кроме того, был организован образовательный симпозиум по терапии заболеваний кожи.

Специальный акцент в научной программе конгресса был сделан на потенциальную связь аллергии и иммунопатологии с развитием рака. Рассматривались лабораторное подтверждение наличия рака и подходы к его лечению, эпидемиология аллергических заболеваний и рака, общие черты первичных иммунодефицитов и злокачественных новообразований, побочные эффекты кожной локализации, вызванные противораковой терапией.

Доклады, дискуссии, презентации

Сотрудники Института иммунологии представили данные широкого спектра экспериментальных исследований молекулярных механизмов аллергопатологии, а также результаты разработки инновационных средств для лечения аллергических заболеваний. На специализированных сессиях и дискуссионных площадках обсуждались экспериментальная модель бронхиальной астмы нейтрофильного фенотипа (А.А. Никольский), влияние РСВ-инфекции на функционирования нуоцитов в ткани легких в модели аллергии

у мышей (А.Р. Гайсина), была проанализирована экспрессия интерлейкина-33 у пациентов с атопической бронхиальной астмой, осложненной респираторной вирусной инфекцией (М.А. Галицкая). Также рассматривались конструирование и исследование терапевтических молекул миРНК против консервативных генов респираторно-синцитиального вируса (И.П. Шиловский), разработка липосомальных носителей для целевой доставки миРНК к клеткам-мишеням (О.О. Колоскова), применение агониста TLR4 для профилактики респираторной вирусной инфекции при аллергическом типе иммунного ответа (А.А. Никонова), зависимость трансфекционной активности от длины молекул ПЭГ (А. Носова).

В докладе И.П. Шиловского были представлены новые результаты по конструированию комплексных противовирусных препаратов, в основе механизма действия которых лежит феномен интерференции РНК. Был сконструирован комплекс, состоящий из молекул миРНК и липотрипептида, выступающего в качестве их носителя. Спроектированные молекулы миРНК были направлены против жизненно важных генов *n* и *p* респираторно-синцитиального вируса, которые необходимы для его репликации в инфицированной клетке. Проведенные исследования продемонстрировали выраженные противовирусные свойства созданного комплекса, который подавлял репликацию вируса в клетке до 100 раз, что было сопоставимо с действием препаратов на основе моноклональных антител. Ввиду высокой стоимости препаратов на основе моноклональных антител данная разработка является перспективной.

Доклад Н.М. Шершаковой был посвящен способности фуллера C_{60} снижать аллергическое воспаление в модели пищевой аллергии на мышах, в сообщении К. Кожиховой рассматривалось применение катионных пептидов в качестве индукторов селективного апоптоза опухолевых клеток. Исследование иммуногенности оригинального синтетического алергоида, состоящего из коротких пептидов Bet v1, встроенных в наночастицы PLGA/хитозан, было представлено в выступлении А.А. Шатилова. На симпозиумах, посвященных изучению иммуномодуляторов, прозвучали доклады о действии гуминовых кислот на аутоиммунное воспаление в адьювантной модели полиартрита и о свойствах новой мощной микробицидной композиции на основе бутаноловой фракции производных гуминовых кислот (Ю.В. Жернов и соавт.). Данные исследования аллергической сенсibilизации у детей с применением молекулярного профилирования были изложены в докладе О.Г. Елисютиной и соавт. Все доклады получили высокую оценку участников конгресса и вызвали активную дискуссию.

На заседании Генеральной ассамблеи ЕААСI на пост следующего президента Академии номинирован генеральный секретарь ЕААСI Peter Hellings (Бельгия). Он вступит в должность на следующем конгрессе ЕААСI, который состоится 1–5 июня 2019 г. в Лиссабоне (Португалия).

Академик Рахим Мусаевич Хаитов

Рахим Мусаевич Хаитов – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, научный руководитель ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, главный аллерголог-иммунолог Минздрава России, член бюро Отделения физиологии и фундаментальной медицины РАН.

Р.М. Хаитов родился в 1944 г. в Самарканде. В 1967 г. он с отличием окончил Самаркандский медицинский институт, в стенах которого начал научную деятельность еще будучи студентом III курса. В 1968 г. защитил кандидатскую диссертацию, в 1972 г. – докторскую, которую подготовил в Москве, в Институте биофизики Минздрава СССР. В 1974 г. в отделе иммунологии Института биофизики организовал и возглавил лабораторию генетического контроля иммунного ответа.

Р.М. Хаитов стоял у истоков создания первого в нашей стране Института иммунологии Минздрава СССР. Он перешел в этот институт вместе с коллективом руководимой им лаборатории. В 1983 г. Р.М. Хаитов был назначен заместителем директора Института иммунологии по научной работе, в 1988 г. стал директором Института иммунологии, который возглавлял до 2015 г.

В 1980 г. Р.М. Хаитову было присвоено звание профессора. В 1991 г. он был избран членом-корреспондентом РАМН, в 1997 г. – действительным членом РАМН, в 2006 г. – действительным членом РАН.

Р.М. Хаитов – известный иммунолог. Он внес значительный вклад в развитие фундаментальных и прикладных аспектов иммунологии, иммуногенетики и биотехнологии. Он является автором и соавтором более 1000 научных работ, в том числе более 70 монографий, руководств и учебников по иммунологии, 49 авторских свидетельств и патентов Российской Федерации, 4 международных заявок, на которые получено 50 патентов в разных странах.

Область профессиональных интересов Р.М. Хаитова: биомедицинские проблемы фундаментальной и прикладной иммунологии, аллергологии и вакцинологии, иммуногенетика, вакцины и лекарства нового поколения, в том числе молекулярные, создание и разработка новых методов диагностики, профилактики и лечения аллергий, опухолевых и инфекционных заболеваний, включая ВИЧ/СПИД, гепатиты, грипп и др.

Р.М. Хаитов с соавторами сформулировал, экспериментально обосновал и внедрил в практику принцип создания высокоэффективных иммуногенов путем конъюгирования антигенов с иммуномодулирующими полиионами, оказывающими прямое активирующее влияние на лимфоциты и фагоциты вследствие взаимодействия с клеточной мембраной. Разработанная противогриппозная вакцина «Гриппол» является одной из лучших в мире, ею успешно вакцинированы миллионы

людей. Впервые разработана кандидатная вакцина против ВИЧ/СПИД с встроенным в ее молекулу иммуномодулятором.

Р.М. Хаитов ведет большую научно-организационную работу. Он является членом рабочей группы по развитию спортивной медицины Совета при Президенте Российской Федерации по развитию физической культуры и спорта, членом Секции № 7 «Медицина и здравоохранение» Межведомственного совета по присуждению премий Правительства Российской Федерации в области науки и техники и членом этого Межведомственного совета. Р.М. Хаитов – председатель Экспертного совета РАН по иммунологии Отделения физических наук РАН и член Экспертного совета РАН, член секции № 1 КНТС Роскосмоса «Космическая биология и физиология», член Центральной аттестационной комиссии Минздрава России, член Научного совета Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», член рабочей группы экспертов по вопросам иммунопрофилактики инфекционных болезней Минздрава России, член Научного совета Минздрава России, эксперт Российского научного фонда. Р.М. Хаитов – председатель совета по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям «иммунология» и «клиническая иммунология, аллергология». С 1988 г. по настоящее время – главный редактор журнала «Иммунология», с 1997 г. – «Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика». Р.М. Хаитов является председателем редакционного совета «Российского аллергологического журнала», членом редколлегий ряда отечественных и международных журналов: «Вестник Академии медицинских наук», «Медицина экстремальных ситуаций», «Аллергология и иммунология», «Имунопатология, аллергология, инфектология», «Цитокины и воспаление», «Медицинская иммунология», «Инфекция и иммунитет», «Сахарный диабет» и др., членом редколлегий информационных изданий по наукам о жизни Всероссийского института научной и технической информации РАН. Ранее Р.М. Хаитов входил в состав редакционных коллегий журналов «AIDS», «Cellular & Molecular Immunology», «Self/Nonself».

Р.М. Хаитов возглавляет Российскую ассоциацию аллергологов и клинических иммунологов (РААКИ), является членом президиума Российского научного общества иммунологов (РНОИ), входит в состав Советов национальных обществ Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСИ) и Всемирной аллергологической организации (WAO).

Р.М. Хаитов активно готовит научные и медицинские кадры. Им создана большая научная школа, под его руководством выполнены и защищены 69 кандидатских диссертаций, 40 его учеников стали докторами наук.

С 2005 г. Р.М. Хаитов возглавляет кафедру клинической аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Выполняя обязанности главного аллерголога-иммунолога Минздрава России, Р.М. Хаитов значительное внимание уделяет совершенствованию аллергологической и иммунологической службы. По его инициативе специальность «аллергология и иммунология» введена в номенклатуру врачебных и провизорских специальностей РФ, в различных регионах страны были созданы лаборатории и центры клинической иммунологии по оценке иммунного статуса населения, профилактике и борьбе со СПИДом. Важной частью организационной работы Р.М. Хаитова является постоянная забота об улучшении условий труда врачей аллергологов-иммунологов, а также о повышении качества специализированной медицинской помощи населению.

Научные достижения и активная научно-организационная деятельность Р.М. Хаитова были отмечены премиями и правительственными наградами. В 1973 г. ему была присуждена премия Ленинского комсомола в области науки и техники, в 1979 г. – пре-

мия им. А.А. Богомольца, в 1995 г. – премия РАН им. И.И. Мечникова. В 2001 г. Р.М. Хаитову была присуждена Государственная премия РФ в области науки и техники за работу «Конъюгированные полимер-субъединичные иммуногены и вакцины», в 1996 г. – премия Правительства РФ в области науки и техники «За разработку, внедрение в промышленное производство и клиническую практику нового типа иммунокорректирующих лекарственных препаратов пептидной природы: тактивина и миелопида», в 2004 г. – премия Правительства РФ в области науки и техники за учебник «Иммунология», в 2012 г. – Государственная премия в области науки и технологий «За выдающиеся достижения в научном и практическом развитии отечественной иммунологии». Р.М. Хаитов награжден почетной грамотой Президента Российской Федерации (2015 г.).

Академик РАН Р.М. Хаитов награжден орденом Трудового Красного Знамени, орденами Почета, «За заслуги перед Отечеством» III и IV степени, а также рядом отраслевых и зарубежных наград.

Редакционная коллегия журнала «Иммунология» сердечно поздравляет Рахима Мусаевича со славным юбилеем и желает ему крепкого здоровья и новых успехов!