



ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ
ФМБА РОССИИ

ОСНОВАН В 1983 ГОДУ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА



**Материалы докладов
XV научной конференции
молодых ученых
«Иммунология сегодня:
традиции и инновации»**

Москва - 2016

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России
Совет молодых учёных ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России



**Материалы докладов
XV научной конференции молодых ученых
«Иммунология сегодня:
традиции и инновации»**

Москва - 2016

Оргкомитет конференции:

Шиловский Игорь Петрович, к.б.н. – председатель оргкомитета.

Кофиади Илья Андреевич, д.б.н.

Назарова Евгения Валерьевна, к.м.н.

Смирнов Валерий Валерьевич, к.м.н.

Жернов Юрий Владимирович, к.м.н.

Колоскова Олеся Олеговна, м.н.с.

Ерошкина Дарья Владимировна, лаборант.

© Авторы работ, 2016

© ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 2016

РОЛЬ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ В ТЕЧЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ АССОЦИИРОВАННОЙ С ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Агаева М.И., Савченко Т.Н

*Кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета
ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова*

Введение. В последние годы проблема вирусных инфекций приобретает все большую актуальность, отмечается ежегодная тенденция роста инфекционных заболеваний вирусной этиологии. Герпесвирусы (ГВ) имеют глобальную распространенность. ГВ способны не только поражать клетки иммунной системы, но и репродуцироваться в них, вызывая, тем самым развитие иммунодефицитных состояний. Особое значение герпетическая инфекция (ГИ) имеет во время беременности. ГИ создает серьезный риск внутриутробного инфицирования (ВУИ) и не благоприятного исхода беременности. Наибольшую опасность во время беременности представляют литические формы ГИ, за счет физиологической супрессорной перестройки иммунной системы. Активация ГВ приводит к развитию ранних цитокиновых реакций, лежащих в основе иммунного ответа.

Материалы и методы. Нами было обследовано 82 женщины 1,2 триместра беременности, в возрасте от 18 до 35 лет, всем женщинами проводились следующие исследования: ПЦР-диагностика фрагментов крови и соскобов эндоцервикса, с целью выявления ДНК ГВ, иммуноферментный анализ (ИФА) для обнаружения вируспецифических антител, а также для определения уровня цитокинов (ИЛ-4,8,10, ИФNg, ФНО-а,) в соскобном материале с эндоцервикса, с использованием тест – систем ООО «Цитокин». Так же были исследованы полиморфизмы генов цитокинов IFNG: +874 (Т/А), IL4 : -33 (С/Т), IL-10:-1082 (G>A), IL18: -137 (G/C), IL8-251 (А/Т).

Результаты. Все обследованные женщины разделены на 2 группы: 1-я группа (n=32), беременные с активным течением ГИ, 2-я группа (n=50) - беременные, с латентным течением ГИ. У 10 (39%) женщин группы 1 – неразвивающаяся беременность, угроза прерывания беременности у 12 (37,5%) женщин 1-ой группы и 8(16%) женщин 2-ой группы, физиологическое течение беременности у 10 (39) женщин 1-ой группы и 38 (84%) женщин 2-ой группы. Выявлено снижение ИЛ-4, -10 ($6,7 \pm 2,19$ 1-группа, $26 \pm 5,04$ 2-я группа) и высокое содержание ИФNg и ИЛ-8 в соскобе с эндоцервикса среди женщин первой группы (1-я группа: $559,89 \pm 220,91$; $32,84 \pm 4,69$ соответственно; 2-я группа: $260,2 \pm 102,57$; $20,62 \pm 4,34$ соответственно ($p < 0,01$). Генотип СТ полиморфизма IL4: -33 (С/Т) определялся в 41 % случаев в 1-ой группе, в 22 % случаев во 2-ой группе, в то время как генотип ТТ данного полиморфизма определялся лишь во 2-ой группе (15%; $p < 0,05$). Генотип СС IL18: -137 (G/C) определялся среди 35% женщин 1-ой группы и 7% женщин 2-ой группы ($p < 0,05$).

Заключение. Полученные данные обосновывают необходимость изучения цитокинового статуса и полиморфизма генов цитокинов у беременных женщин, а также при подготовке беременности с целью формирования групп риска по активации ГИ и невынашиванию беременности.

АКТИВАЦИЯ TLR-АГОНИСТАМИ ДВУХ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ МЕХАНИЗМОВ В ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ

Багаев А.В., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И.

*Лаборатория активации иммунитета
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России*

Введение. Дендритные клетки (DC) традиционно считаются профессиональными стражами иммунной системы человека, представляющими антигены Т-клеткам и регулируемыми иммунные реакции как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Также давно известно, что роль DC в опухолевом процессе неоднозначна. С одной стороны они

участвуют в формировании противоопухолевых цитотоксических лимфоцитов, с другой стороны, создают про-опухолевое окружение, способствующее росту злокачественной ткани.

Сравнительно недавно, было обнаружено, что, помимо индукции и управления иммунными ответами организма, DC способны оказывать прямое противоопухолевое действие. В настоящее время интенсивно изучаются природа (фенотип и линия дифференцировки) дендритных клеток-киллеров, сигналы, активирующие их цитотоксическую активность, и молекулярные механизмы убийства опухолевых клеток.

В нашей работе исследована возможность индукции противоопухолевых свойств дендритных клеток *in vitro* под действием фармацевтического TLR4-агониста «Иммуномакс» в сравнении с другими агонистами TLR4 (LPS, MPLA), а также с помощью агонистов других Toll-like рецепторов (TLR1/2, 2/6, 3, 5, 7, 9). Исследованы несколько возможных молекулярных механизмов действия DC на опухолевые клетки-мишени, в частности: (1) молекулы суперсемейства TNF (TNF- α , TNFR1, TRAIL, Fas-L); (2) NO, ROS и продукт их реакции пероксинитрит; (3) интерфероны I типа.

Материалы и методы. В работе использовались методы дифференцирования дендритных клеток из плюрипотентных клеток костного мозга мыши или циркулирующих моноцитов крови человека под действием ростовых факторов, проточная цитофлуориметрия и фенотипирование клеток, сортировка клеток на лазерном проточном сортировщике, конфокальная микроскопия, методики анализа апоптоза и цитотоксических свойств клеток, изучение взаимного влияния двух типов клеток, разделенных непроницаемой для клеток мембраной в трансвеллах, анализ экспрессии цитокинов и хемокинов по концентрации секретируемого белка (метод СВА) и по интенсивности транскрипции (количественная RT-PCR), измерение активности iNOS и продукции ROS.

Результаты. В модели 4T1 рака грудной железы мыши установлено, что фармацевтический TLR4-агонист Иммуномакс, а также лиганды TLR3, TLR4, TLR9 переводят дендритные клетки из состояния «нянек», способствующих росту опухоли, в состояние противоопухолевых DC, оказывающих сильное супрессирующее действие на рост опухоли. Доказано, что подавление роста опухоли основывается на двух эффектах – индукции апоптоза клеток опухоли и замедлении деления опухоли. Показано, что противоопухолевое действие DC не связано с клеточными контактами и может осуществляться дистантно – переносится через мембрану трансвела и с супернатантом культуры активированных DC. При использовании специфических блокирующих антител было обнаружено, что эффект супрессии не связан с молекулами суперсемейства TNF. Ингибитор NO-синтазы и ингибитор пероксинитрита значительно, но не полностью, снижали противоопухолевую активность DC, а одновременное блокирование выработки пероксинитритов и интерферонов первого типа полностью выключало противоопухолевую активность DC. Полученные данные указывают на использование дендритными киллерами двух самостоятельных противоопухолевых механизмов: (1) близкодистантный короткоживущий пероксинитрит, действие которого проявляется в совместной культуре TLR4-активированных DC и клеток опухоли, а также при их совместном культивировании в разделенных полупроницаемой мембраной ячейках трансвела; и (2) интерферон-бета, с действием которого связана противоопухолевая активность супернатантов культур активированных DC.

Заключение. DC успешно применяются при иммунотерапии различных злокачественных новообразований, поэтому полученные нами сведения о сигналах, индуцирующих противоопухолевую активность DC, и о молекулярных механизмах действия активированных DC на опухолевые клетки-мишени помогут лучше понять механизмы клеточной иммунотерапии рака, и повысить ее эффективность. Кроме того, раскрытые молекулярные механизмы объясняют ранее описанные успешные результаты лечения метастатического рака с помощью фармацевтических агонистов TLR в экспериментальных моделях и в клинических исследованиях. Результаты работы могут быть использованы для иммунотерапии онкологических больных.

ВОПРОСЫ ЭКСТРАПОЛЯЦИИ НА ЧЕЛОВЕКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ПОЛИОКСИДОНИЯ

Банюк Е.В., Смирнова А.С.

Лаборатория № 11 Лекарственно-диагностических форм

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России;

ООО «Петровакс Фарм»

Введение. Изучение фармакокинетики (ФК) является составной частью доклинических исследований лекарственных средств (ЛС). По результатам экспериментального изучения возможно предсказать концентрацию ЛС в крови (плазме) или, по меньшей мере, скорость её снижения у человека, и таким образом выбрать ориентировочную схему дозирования, которая может быть затем уточнена в ходе клинических исследований.

Материалы и методы. В работе использовался единственно возможный метод идентификации Полиоксидония в биосубстратах: получение меченой тритием субстанции препарата. Исследования выполнены на двух видах животных в соответствии с Методическими рекомендациями по проведению доклинических исследований фармакокинетики ЛС. Радиоактивность биосубстратов считали на сцинтилляционном счётчике Wallac 1409 DSA, фармакокинетические параметры рассчитывали с использованием внемодельного метода статистических моментов.

Результаты. Основные фармакокинетические параметры Полиоксидония изучены при внутривенном введении крысам и кроликам. Установлено, что препарат быстро распределяется в организме, покидает сыворотку крови в две фазы. Период полуэлиминации препарата составляет 25 часов для крыс и 59 часов для кроликов, среднее время удержания в организме (MRT) соответственно 34,5 и 83 часа. Общий клиренс для крыс составляет 129 мл/час/кг, для кроликов - 60 мл/час/кг. Стационарный объем распределения соответственно равен 4,8 л/кг и 4,56 л/кг, что считается средней величиной. Полиоксидоний в организме не подвергается метаболизму с участием ферментов СYP 450, а деградирует до низкомолекулярных олигомеров, которые выводятся почками. Этот факт и близость эффективной фармакологической дозы у животных и человека дали основания для доказательства возможности экстраполяции на человека ФК параметров Полиоксидония, используя аллометрические коэффициенты подобия.

Заключение. Хорошее совпадение результатов экстраполяции на человека ФК параметров Полиоксидония, полученных как в исследованиях на крысах, так и на кроликах, свидетельствует об адекватности выбранной модели экстраполяции.

Благодарность нашему учителю Ивановой А.С. за радость понять и познать.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ И ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ВОДОРАСТВОРИМОГО ФУЛЛЕРЕНА C₆₀

Барабошкина Е.Н., Шершакова Н.Н., Шабанова Д.Д., Андреев С.М., Хаитов М.Р.

Лаборатория №72 Пептидных иммуногенов

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Введение. Целью данной работы было оценить токсическое действие водного раствора C₆₀, полученного «диализным методом», а также изучить иммуномодулирующие эффекты фуллерена на модели реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Материалы и методы. Токсический эффект фуллерена C₆₀ оценивали путем однократного введения (внутривенно (в/в), внутрибрюшинно (в/б) и интрагастрально (и/г)) препарата мышам линии Balb/c в различных дозах (в/в: 2, 8, 40, 200 мкг/мышь; в/б: 40, 80, 160, 200, 320, 500, 1000, 2700 мкг/мышь; и/г: 1000 мкг/мышь). В качестве отрицательного контроля животным вводили ФСБ. За изменениями веса и поведения животных наблюдали в течение 7 дней после инъекции C₆₀. Далее методом гистологического анализа проводили

оценку патологических изменений внутренних органов. Для оценки иммуномодулирующих свойств фуллерена, реакцию ГЗТ индуцировали у мышей BALB/c путем подкожной инъекции 100 мкг/мышь гемоцианина улитки (KLH), эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда. На 14-й день после инъекции проводили разрешающую внутривенную инъекцию KLH в подушечку лап животных. 2 мкг/мышь C₆₀ вводили внутривенно за 24 ч до сенсибилизации KLH. CsA использовали в качестве положительного контроля. Величину ГЗТ реакции определяли путем измерения толщины подушечки лапы до и после разрешающей инъекции KLH с использованием цифрового микрометра. Уровень продукции цитокинов определяли методом ИФА в супернатантах клеток селезенки, стимулированных KLH.

Результаты. Было показано, что независимо от способа введения фуллерена токсических проявлений и изменения поведения животных выявлено не было. Потери веса у мышей тоже не наблюдалось. Гистологическое исследование не выявило каких-либо патологических изменений, воспалительных и некробиотических процессов, атрофии, кровоизлияний и новообразований в органах и тканях мышей.

Введение C₆₀ значительно ослабило воспалительную реакцию ГЗТ. Было показано, что отек лап у группы опытных животных уменьшился на 30% по сравнению с модельной группой. Анализ уровней цитокинов показал значительное снижение IL-4, IL-5, IL-17, IFN γ и TNF α у мышей, получавших C₆₀.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о биологической безопасности немодифицированной формы фуллерена. Введение C₆₀ оказывает существенное иммуномодулирующее действие на реакцию ГЗТ. Таким образом, фуллерен C₆₀ может стать перспективным средством для терапии аллергических патологий.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение № 14.604.21.0059 от 27 июня 2014, уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0059).

ВЛИЯНИЕ ОЖИРЕНИЯ НА ТЕЧЕНИЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Глушкова Е.Ф., Шартанова Н.В.

Научно-консультативное отделение

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Введение. В последние годы в медицинской литературе широко обсуждается проблема влияния ожирения и избыточного индекса массы тела (ИМТ), как фактора риска формирования бронхиальной астмы (БА), причины недостаточного ее контроля и влияния на особенности развития аллергического воспаления дыхательных путей. Однако характер этих взаимовлияний изучен недостаточно, данные по этому вопросу противоречивы и требуют уточнения.

Целью настоящего исследования являлось изучить распространенность ожирения у больных БА и влияние ИМТ и ожирения на развитие и степень тяжести БА у пациентов, наблюдавшихся в амбулаторных и стационарных условиях.

Материалы и методы. В скрининге проведен ретроспективный анализ 263 историй болезни пациентов с БА, находившихся на лечении в стационаре и 3500 амбулаторных карт больных БА, наблюдавшихся в Институте Иммунологии в 2014 году. При анализе медицинской документации особое внимание уделялось выявлению особенностей развития БА (факторы риска), клинического течения и ответа на проводимую терапию у пациентов с ожирением и нормальным ИМТ.

Результаты. При ретроспективном анализе установлено, что среди стационарных больных БА масса тела была нормальной у 44,5%. Ожирение установлено у 22%, а у 33,5%

больных выявлена избыточная масса тела. При этом чаще ожирением страдали женщины – 72%. Среди больных БА, наблюдавшихся в амбулаторных условиях, нормальную массу тела имели 62%. У 19% амбулаторных больных выявлена избыточная масса тела и у 17% - ожирение. При анализе особенностей клинического течения БА у больных с ожирением и нормальной массой тела, зависимости степени тяжести БА от наличия ожирения и избыточного ИМТ не выявлено. На тяжесть клинического течения БА у больных с ожирением оказывало влияние возраста, длительность заболевания, наличие сопутствующей патологии. Клиническая эффективность лечения БА у пациентов с ожирением, зависела от своевременности назначения и адекватности стандартной терапии, соответствующей рекомендациям международных согласительных документов (GINA 2014). Частота обращаемости по поводу обострений БА у пациентов с ожирением и с нормальной массой тела была сопоставимой: 15% и 14% соответственно.

Заключение. В настоящем исследовании установлена высокая распространенность ожирения и повышенного ИМТ у больных БА (от 17% до 22%). Отсутствие влияния ожирения на степень тяжести БА и эффективность противоастматической терапии, выявленное в настоящем исследовании, мотивирует необходимость продолжения и расширения параметров изучаемых клинических, лабораторных, функциональных и других показателей с целью уточнения роли различных патогенетических механизмов в формировании астмы и контроле за ее симптомами.

СОЗДАНИЕ НОВОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ CRISPR-CAS9 ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МУРАМИЛПЕПТИДОВ

Дагиль Ю.А., Арбатский Н.П., Мазуров Д.В., Львов В.Л., Пашенков М.В.
*Лаборатории клинической иммунологии, препаративной биохимии и иммунохимии
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России*

Введение. Мурамилпептиды – мономерные фрагменты пептидогликана бактерий, играющие важную роль в запуске врожденного иммунного ответа. Интерес к данным соединениям обусловлен их ролью в функционировании врожденного иммунитета, а также возможностью применения в качестве иммуностимуляторов и адъювантов. Мурамилпептиды распознаются рецепторами NOD1 и NOD2. Мы разработали новую клеточную модель для оценки биологической активности мурамилпептидов, представляющую собой модифицированные клетки НЕК293Т с нокаутом NOD1, NOD2 или обоих этих генов.

Материалы и методы. Для получения линии 293Luc в геном клеток НЕК293Т был введен ген люциферазы под NF-κB-зависимым промотором. Для получения одинарного нокаута по технологии CRISPR-Cas9 клетки 293Luc были трансфицированы 3 плазмидными конструкциями: две плазмиды, кодирующие sgRNA целевого гена, и плазмидой pcDNA3.3-Cas9n, кодирующей Cas9-никазу. Клоны с нокаутом целевых генов отбирали по отсутствию ответа на специфические агонисты NOD1 и NOD2. Ответ оценивали методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции по NF-κB зависимой экспрессии люциферазы. нокаут подтверждали секвенированием целевого участка гена. Для получения двойного нокаута клетки с нокаутом NOD1 были подвергнуты процедуре выключения гена NOD2 по аналогичной методике.

Результаты. С помощью вновь созданных моделей было показано, что NOD2 имеет более широкий спектр агонистов, чем полагали ранее, т.к. может распознавать мурамилпептиды грамотрицательных бактерий, содержащие остатки мезодиаминопимелиновой кислоты (мезо-ДАП). При этом предпочтительно, чтобы остаток мезо-ДАП присутствовал не в концевом положении. Ключевым условием для распознавания этих мурамилпептидов рецептором NOD2 является интактный остаток N-ацетилмурамовой кислоты. Мурамилпептиды, содержащие остатки мезо-ДАП не в концевом положении, могут

активировать также NOD1 рецептор, но, вероятно, требуют предварительного процессинга эндосомальными пептидазами.

Заключение. Мурамилпептиды грамотрицательных бактерий, содержащие Мезо-ДАП, являются агонистами как NOD1, так и NOD2 рецепторов, что необходимо принимать во внимание при разработке иммуностимуляторов и адъювантов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОФОРМ ЛИМФОЦИТАРНОГО ФОСФАТАЗО-АССОЦИИРОВАННОГО ФОСФОПРОТЕИНА

Круглова Н.А., Мешкова Т.Д.

Лаборатория иммунохимии

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Введение. Лимфоцитарный фосфатазо-ассоциированный фосфопротеин (LPAР) является поверхностным белком лимфоцитов и входит в комплекс с фосфатазой CD45. Уровень фосфорилирования LPAР изменяется при активации клеток. Предположительно, LPAР участвует в регуляции активности CD45, однако подробности этого процесса неизвестны. Для того чтобы приблизиться к пониманию функции LPAР, была поставлена задача охарактеризовать протеоформы белка в клеточных линиях и первичных клетках в норме и при стимуляции.

Материалы и методы. Для характеристики протеоформ из клеточных линий (СЕМ, Jurkat, HUT78, Raji, YT и KG1a) использовали метод флуоресцентного иммунопреципитационного анализа (FIPA), совмещенного с разностным двумерным электрофорезом (2D-DIGE). В экспериментах по стимуляции клетки инкубировали с PMA в течение 4 ч. Тимоциты выделяли из операционного материала тимуса, полученного из МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Линию СЕМ CD45 КО получили на основе линии СЕМ с помощью CRISPR/Cas9 технологии.

Результаты. В клеточной линии СЕМ было обнаружено по крайней мере пять протеоформ LPAР, четыре из которых связаны с фосфорилированием. Количественный анализ протеоформ показал, что более 80% LPAР фосфорилировано. При стимуляции клеток с помощью PMA происходило частичное дефосфорилирование LPAР. Клеточные линии СЕМ, Jurkat, HUT78, Raji, YT и KG1a имели сходные наборы протеоформ, но различались по соотношению между ними. Наибольшее отличие было замечено для В-клеточной линии Raji. При стимуляции число протеоформ уменьшалось, паттерны фосфорилирования в клеточных линиях изменялись по-разному. В тимоцитах LPAР также был фосфорилирован, но имел только одну мажорную фосфоформу. В линии клеток СЕМ, нокаутной по молекуле CD45, паттерны фосфорилирования LPAР как в норме, так и при стимуляции были в целом такими же, как и в СЕМ дикого типа.

Заключение. В клеточных линиях LPAР представлен как минимум пятью протеоформами, четыре из них являются фосфоформами. В неактивированных клетках большая часть молекул LPAР находится в фосфорилированном состоянии. При стимуляции клеток с помощью PMA происходит частичное дефосфорилирование LPAР. В тимоцитах белок имеет иной паттерн фосфорилирования по сравнению с клеточными линиями. Нокаутирование фосфатазы CD45 не приводит к изменению набора протеоформ LPAР.

Благодарности. Научному руководителю Филатову А.В. и всему коллективу лаборатории, а также Митину А.Н., позволившему получить материал тимуса.

АЛЛЕРГЕННОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ МОДИФИЦИРОВАННОГО ЭКСТРАКТА ИЗ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ *DERMATOPHAGOIDES* *PTERONYSSINUS*

Ласкин А.А.¹, Андреев С.М.², Бабахин А.А.¹

¹ Лаборатория персонализированной медицины и молекулярной иммунологии

² Лаборатория пептидных иммуногенов

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Введение. Совершенствование аллергенной иммунотерапии (АИТ) является актуальной задачей клинической аллергологии. Целью работы являлось изучение аллергенных и иммуногенных свойств экстракта клещей домашней пыли (D1) *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) после его модификации методом ацилирования.

Материалы и методы. Экстракт D1 полученный из ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» (10000 PNU/мл) был химически модифицирован методом сукцинирования (сD1). В полученных образцах (D1 и сD1) определяли концентрацию белка, исследовали их с помощью гель-хроматографии (ГХ) и изменение оптической активности методом кругового дихроизма (КД). Степень модификации сD1 определяли количественным TNBS-методом. Изучение аллергенности сD1 проводили методом определения высвобождения гистамина *in vitro* из лейкоцитов цельной крови больных сенсibilизацией к Der и методом торможения РАСТ. Иммуногенность D1 и сD1 оценивали путем иммунизации мышей BALB/c как с Al(OH)₃, так и без адьюванта. Уровни анти-D1 IgE-, IgG1-, IgG2a-антител в индивидуальных сыворотках мышей определяли с помощью ИФА.

Результаты. Сукцинирование D1 привело к получению образца сD1 с 98,9 % модификацией ε-групп лизина. С помощью КД выявлено изменение оптической активности D1 и сD1, а данные ГХ указывают на хроматографического профиля. Методом торможения РАСТ выявлено существенное снижение сD1-связывания Der p – специфическим IgE, также выявлено значительное снижение уровня гистамина, высвобождающегося из лейкоцитов крови больных при инкубации с сD1.

При иммунизации мышей сD1 уровни анти-Der p IgE были существенно ниже таковых при иммунизации D1. В то же время, специфический IgG1-ответ был сравним с ответом на D1, а уровень анти-Der p IgG2a был значительно выше при иммунизации сD1, как с адьювантом, так и без него, по сравнению с иммунизацией D1.

Заключение. Модификация экстракта клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* путем сукцинирования позволяет получить аллергоид, обладающий пониженной аллергенностью и сохраненной иммуногенностью.

Благодарности. Выражаю благодарность Бержец В.М. и Самойликову П.М. (ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова») за предоставленный экстракт D1 анализ IgE-связывающей активности сD1.

МЕХАНИЗМЫ УСИЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНА В СОСТАВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА В АНТИГЕН- ПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ

Лебедева Е.С., Багаев А.В., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И.

Лаборатория активации иммунитета

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Введение. Иммунизация рекомбинантными аденовирусными векторами (rAd) обеспечивает высокий уровень экспрессии целевого антигена и, как следствие, индукцию интенсивных реакций эффекторных Т-клеток и формирование долгоживущего пула клеток памяти. В настоящей работе исследованы механизмы регуляции продукции антигена rAd при воздействии на антиген-презентирующие клетки агонистами TLR. Оценено влияние

усиления и уменьшения экспрессии целевого антигена на индукцию ответа антиген-реактивных Т клеток.

Материалы и методы. В работе использовались культуры первичных и трансформированных клеток, их трансдукция рекомбинантными векторами, измерение уровня продукции репортерных и целевых белков, проточная цитофлуориметрия, сортировка клеток, анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени, ELISPOT и др.

Результаты. Агонисты TLR2, 4, 5, 7/8 и 9 (MyD88→NF-κB ось) значительно увеличивают, а агонист TLR3 (TRIF→IRF3/7 ось) подавляет производство целевого белка rAd. Молекулярный механизм усиления и подавления продукции целевого белка состоит в регуляции транскрипции мРНК целевого гена rAd. Усиление экспрессии трансгена определяется активацией NF-κB и, как следствие, CMV-промотора rAd.

Эффекты усиления и подавления экспрессии передаются паракринно от клеток, активированных TLR-агонистами, к интактным клеткам. Паракринная передача сигналов усиления и подавления определяется секрецией провоспалительных цитокинов (TNFα) и интерферонов I типа (IFN-β), соответственно. Ингибирование продукции IFN-β приводит к возрастанию экспрессии целевого белка rAd. Сочетанное усиление экспрессии трансгена с помощью агониста TLR-4 и ингибирование синтеза IFN-β приводит к дополнительному усилению экспрессии трансгена.

При активации антиген-презентирующих дендритных клеток агонистами TLR возрастает ответ антиген-реактивных Т клеток. Несмотря на существенное снижение экспрессии антигена в случае активации TLR3, заметного ингибирования Т-клеточных ответов не наблюдалось.

Заключение. TLR-опосредованная активация сигнальной оси MyD88→NF-κB усиливает, а активация сигнальной оси TRIF→IRF подавляет экспрессию rAd в антиген-презентирующих клетках. Оба эффекта регулируются на уровне транскрипции мРНК целевого белка. Усиление связано с активацией транскрипционного фактора NF-κB и CMV-промотора трансгена. Подавление экспрессии трансгена определяется индукцией синтеза интерферонов I типа. При этом снижение экспрессии rAd в антиген-презентирующих клетках не нарушает индукции ответа антиген-реактивных Т клеток.

ВЛИЯНИЕ ВОДНОЙ ДИСПЕРСИИ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ

Макарова Э.А., Шершакова Н.Н., Андреев С.М., Хаитов М.Р.

*Лаборатория персонализированной медицины и молекулярной иммунологии
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России*

Введение. В последние годы появляется все больше доказательств, что окислительный стресс играет важную роль во многих кожных заболеваниях, включая АД. В то же время известно, что наноуглеродный материал, фуллерен C₆₀ в форме водного раствора, проявляет противовоспалительную и противоаллергическую активности, и в химическом отношении способен нейтрализовать активные формы кислорода и свободные радикалы. Целью данной работы было изучить способность фуллерена C₆₀ влиять на степень проявления аллергического воспаления, а также на выработку патогенетически значимых цитокинов.

Материалы и методы. Исследования проводили на модели атопического дерматита *in vivo* на мышах линии Balb/c. Мышей сенсibilizировали путем 3-кратных накожных аппликаций с овальбумином (ОА). Между аппликациями животные получали фуллерен C₆₀. После третьего этапа сенсibilизации проводили забор крови, селезенки и образцов кожи для анализа.

Результаты. Было показано, что у мышей, получавших фуллерен при моделировании АД уровень ИЛ-4, IgE достоверно снижался. Показано также, что уровень ИЛ-17А

повышался. Кроме того, было отмечено снижение уровня ИЛ-13 по сравнению с контрольной группой и тенденция к повышению ИЛ-12 и ИФН- γ .

Заключение. На основании полученных данных, можно сделать вывод о том, что под действием фуллерена C60 при моделировании АД происходит сдвиг иммунный ответ в сторону Th1. Таким образом, фуллерен C60 может стать перспективным противоаллергенным препаратом.

НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО ОТЕКА (НАО) I И II ТИПА

Мартынова И.А., Латышева Е.А., Латышева Т.В.

*Отделение иммунопатологии взрослых
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России*

Введение. Наследственный ангионевротический отек (НАО) – редкое жизнеугрожающее заболевание, основными проявлениями которого являются рецидивирующие отеки, связанные с накоплением брадикинина вследствие недостатка количества или функциональной активности C1 ингибитора. По нашим данным, в 86% случаев диагноз устанавливается более чем с 5-летней задержкой. Одной из причин поздней диагностики является техническая недоступность и дороговизна имеющихся диагностических тестов. Так как в патогенезе НАО активно участвуют процессы коагуляции и фибринолиза, большой интерес уделяется изучению уровня этих показателей (в частности D-димера). Доступность и простота метода делает перспективным возможность его использования для скрининга больных и оценки тяжести течения заболевания.

Существующие терапевтические опции (андрогены, антифибринолитики, C1-ингибитор) имеют серьезные недостатки: дороговизна, выраженные побочные эффекты. В качестве новых препаратов долгосрочной профилактики НАО у молодых женщин рассматриваются прогестины, показавшие свою эффективность по данным ограниченных клинических наблюдений.

Материалы и методы. Уровень D-димера был измерен у 12 пациентов с НАО I и II типа в межприступный период.

Эффективность прогестинов в качестве долгосрочной профилактики НАО I и II типа была исследована у 13 пациенток от 16-43 лет (средний возраст - 31 год), принимающих препараты этой группы от 1 – 20 месяцев (в среднем - 5,7 месяцев).

Результаты. Уровень D-димера был повышен у 6 из 12 пациентов. В большинстве случаев пациенты, у которых было выявлено повышение уровня D-димера, страдали более тяжелой формой НАО.

Уменьшение клинических проявлений заболеваний было отмечено у 69% пациенток (9/13), принимавших прогестины, из них больший эффект был отмечен на препаратах, обладающих антигонадотропными свойствами - 89% пациенток (8/9).

Заключение. Дальнейшее исследование уровня D-димера и других показателей свертывания крови (в тч во время атаки) представляется перспективным, так как эти тесты доступны рутинной практике.

Учитывая, что прогестины имеют более высокий профиль безопасности, небольшую стоимость и удобный режим приема, дальнейшее исследование их применения в качестве долгосрочной профилактики НАО, особенно у женщин детородного возраста, представляет перспективное направление. Согласно полученным данным, предпочтение следует отдавать препаратам, с более выраженными антигонадотропными свойствами.

Благодарности. Джобава Элисо Мурмоновна

ИДЕНТИФИКАЦИЯ САЙТОВ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ЛИМФОЦИТАРНОГО ФОСФАТАЗО-АССОЦИИРОВАННОГО ФОСФОПРОТЕИНА

Мешкова Т.Д., Круглова Н.А.

Лаборатория иммунохимии

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Введение. Лимфоцитарный фосфатазо-ассоциированный фосфопротеин LPAP представляет собой поверхностный трансмембранный белок лимфоцитов. Он был описан достаточно давно, но до сих пор мало изучен. Тесная ассоциация данного белка с фосфатазой CD45 и его фосфорилирование при активации лимфоцитов позволяет предположить, что белок LPAP принимает участие в регуляции иммунного ответа. Нашей задачей является исследование фосфорилирования белка LPAP.

Материалы и методы. Список потенциальных сайтов фосфорилирования получен с помощью программы NetPhos. Для проверки предсказанных сайтов проводили сайт-специфичный мутагенез гена LPAP. Плазмиды с мутантными формами LPAP временно трансфецировали в HEK293 клетки или стабильно трансфецировали в Т-клеточную линию СЕМ-CCR5. В линии СЕМ предварительно нокаутировали эндогенный LPAP с помощью технологии CRISPR/Cas9. Фосфорилирование LPAP анализировали по электрофоретической подвижности в SDS-PAGE, окраски Pro-Q Diamond, двумерного электрофореза (2D-DIGE) и методом тандемной масс-спектрометрии.

Для изучения фосфорилирования белка LPAP и проведения *in vitro* киназных тестов, нами отработывалась методика наработки рекомбинантного белка LPAP3 в *E. coli*.

Результаты. Было установлено, что мутации в 99 и 153 положениях вызывали уменьшение числа фосфорформ белка LPAP. При мутации в 172 положении исчезает одна группа фосфорформ. У белка с двойной мутацией по 99, 153 сайтам оставалось только одна фосфорформа, связанная с фосфорилированием 172 сайта. Наконец, белок с тройной мутацией имел только одну мажорную протеоформу.

Был подобран штамм BL21 DE3 pLysS для лучшей наработки рекомбинантного белка LPAP3, установлены оптимальные условия наращивания бактериальной культуры до OD₆₀₀ 0.8, индукции бактерий с IPTG в течение 4-6 часов при 30°, подобран метод выделения белка в нативных условиях.

Заключение. Идентифицированы сайты фосфорилирования LPAP S99, S172 и S153/S155. Дальнейшая работа необходима для определения функциональной значимости фосфорилирования LPAP по этим сайтам. Подобраны условия для оптимальной наработки и выделения белка, которые позволят изучить фосфорилирование белка *in vitro*.

Благодарности. Научному руководителю и заведующему лабораторией Филатову А.В., за помощь по молекулярной части работы ведущему научному сотруднику Мазурову Д.В. и всему коллективу лаборатории.

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРИЗМА ГЕНОВ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ С РАЗВИТИЕМ ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ С ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМОЙ

Платунова М.С.¹, Каплунова М.Ю.², Борисов В.С.², Абрамов В.Ю.²

¹*Кафедра физики живых систем*

Московский физико-технический институт (ГУ)

²*Московский городской ожоговый центр*

ГБУЗ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

Введение. Термическое поражение кожи и подлежащих тканей ведет к развитию воспалительной реакции, сопровождающейся нарушением микроциркуляции в зоне паранекроза, общим угнетением функции иммунной системы и развитием сопутствующих

осложнений. Одним из тяжелых осложнений, в этиологии которых воспаление играет важную роль, является тромбоз венных сосудов. По нашим данным, частота тромботических осложнений (ТО) достигает 6,3%. Предрасположенность к развитию тромбозов в значительной степени обусловлена генетическим фактором, однако роль генов в развитии ТО у больных с термической травмой не изучена. Целью настоящего исследования стало изучение связи полиморфизма генов факторов свертывания крови с развитием ТО при термической травме и установление возможности формирования групп повышенного риска развития ТО на основе генетического анализа.

Материалы и методы. Обследовали пациентов, находившихся на лечении в МГОЦ (N=61). ТО диагностировали у 13 пациентов. Геномную ДНК выделяли из венозной крови, хранившейся до исследования при -40 С в течение 1-12 мес. Анализировали однонуклеотидные генетические полиморфизмы, для которых ранее была продемонстрирована связь с тромбофилией: 202190 G>A протромбина (F2); лейденская мутация 1691 G>A коагуляционного фактора V (F5); 10976 G>A коагуляционного фактора VII (F7); F13: G>T; мутация -455 G>A бета фибриногена (FGB); мутация ингибитора активатора плазминогена PAI-1 -675 5G/4G; ITGA2: 807 C>T; 176 T>C тромбоцитарного рецептора фибриногена (ITGB3). Результаты типирования сопоставили с развитием или отсутствием ТО у пациента. Статистическую значимость обнаруженных ассоциаций оценивали, применяя точный критерий Фишера с поправкой Бонферрони на число сравнений. Работа выполнена на оборудовании и с применением реагентов для экстракции ДНК и генотипирования производства ЗАО «НПФ ДНК-технология» (Россия).

Результаты. ТО развились у одного из 24 пациентов, гомозиготных по аллелю 4G (4G/4G) гена PAI-1, и у 12 из 37 пациентов, которые несли аллель 5G в гомо- или гетерозиготном состоянии (5G/5G или 5G/4G) ($p_{\text{корр}}=0,02$). Различий в частоте других изученных генетических полиморфизмов, связанных с развитием ТО, обнаружено не было.

Заключение. Выявление генетической предрасположенности к развитию ТО у ожоговых больных позволит выделить группу пациентов с тяжелой термической травмой, для которых характерен высокий риск развития указанных осложнений.

Благодарности. Работа поддержана частично грантом Фонда имени Максима Климova.

НОВЫЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ УРОВНЯ вкДНК В ДИАГНОСТИКЕ КРИЗА ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА

Родионов А.А.,¹ Кофиади И.А.,¹ Абрамов В.Ю.,² Алексеев Л.П.¹

¹ ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

² ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»

Введение. В настоящий момент летальные осложнения у реципиентов трансплантата, связанные с применением иммуносупрессивных препаратов, остаются важной проблемой, требующей решения. Снижение фармакологической нагрузки без повышения риска развития отторжения трансплантата возможно при наличии недорогого метода количественной диагностики ранних биомаркеров отторжения. К перспективным биомаркерам относится вкДНК (внеклеточная ДНК), появляющаяся в крови реципиента в результате разрушения клеток трансплантата. Текущие методы количественной оценки вкДНК в силу дороговизны и сложности неприменимы для целей мониторинга. Мы разработали новый метод, основанный на использовании аллель-специфичных LNA-зондов, ингибирующих ПЦР-амплификацию высокопредставленной ДНК матрицы реципиента, что обеспечивает высокую чувствительность реакции. Использование в качестве молекулярной мишени распространённого в популяции диаллельного INDEL полиморфизма снижает необходимость в индивидуальном дизайне тест-систем под каждую пару донор-реципиент. Добавление в реакцию флуоресцентного красителя позволяет оценить количество исходных ДНК-мишеней донора в образце.

Материалы и методы. Для подбора INDEL мишени были использованы базы данных NCBI, UCSC, Ensembl, Mammalian Genotyping Service. Для дизайна праймеров использовались ресурсы NCBI, UCSC, а также программы Oligo, SeqMan. Температуру отжига LNA-зондов определяли с помощью ресурса Exiqon LNA Oligo Tools. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Для постановки ПЦР в реальном времени использовали амплификатор DT-96 (ООО «ДНК-Технология», Россия) и интеркалирующий краситель EvaGreen. Чувствительность тест-системы определяли методом серийных разведений, используя в качестве мишени продукты ПЦР, клонированные в стандартный вектор pAL2-TA (ЗАО «Евроген» Россия).

Результаты. Разработана тест-система для определения INDEL полиморфизма rs67490327 (dbSNP). Метод обладает аналитической чувствительностью на уровне 15 копий ДНК на реакцию (3 копии/мкл) и позволяет проводить генотипирование образцов ДНК при соотношении специфической ДНК-мишени к высокопредставленной ДНК матрице $1/10^5$ (0.001%).

Заключение. Аналитические характеристики разработанной тест-системы позволяют использовать метод в качестве надежного и недорогого неинвазивного диагностического инструмента при иммунологическом мониторинге реципиентов, проходящих курс иммуносупрессирующей терапии, а также для целей ранней диагностики развития криза отторжения трансплантата.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ХОЛЕСТЕРИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ МАТРИКСНОГО БЕЛКА В СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ВИРУСА ГРИППА А/WSN/33

Синявин А.Э., Кост В.Ю., Цфасман Т.М., Маркушин С.Г.

Лаборатория генетики РНК-содержащих вирусов

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.
Мечникова»*

Введение. Матриксный белок вируса гриппа М1 является мембранно-связанным белком, формирующий матриксный слой под мембраной, тем самым обеспечивая правильное строение вириона. В аминокислотной последовательности М1 белка нами было обнаружено шесть холестерин-связывающих консенсусных последовательностей, имеющих следующий вид: [L,V]-Aa₁₋₅-Y-Aa₁₋₅-[R,K]. Целью данного исследования было выяснение роли данных доменов в составе α -спиралей М1 белка.

Материалы и методы. Для проверки функциональной роли доменов, были произведены нуклеотидные замены в аминокислотных последовательностях, которые являются их составными частями с помощью сайт-специфического мутагенеза. Введение необходимых мутаций и отсутствие дополнительных в М1 гене подтверждалось путем секвенирования копий кДНК полученных из РНК. Мутантные вирусы получали методом обратной генетики с использованием 293Т и MDCK клеточных линий, с последующим заражением вирусосодержащей жидкостью 9-ти дневных куриных эмбрионов в аллантоисную полость. Фенотип подтверждали оценкой репликации вирусов в легких мышей. Морфологические изменения полученных мутантных вирусов изучали с помощью электронной микроскопии.

Результаты. Все полученные вирусы обладали сходным фенотипом. Имели аналогичные титры на куриных эмбрионах что и «дикий» штамм вируса гриппа А/WSN/33 и проявляли *ts+* фенотип (размножение при повышенной температуре 34⁰С-38⁰С). Фенотип *ts+* является маркером аттенуации. Тем не менее, в этом случае можно сказать, что не образуется аттенуированных вариантов вирусов, что подтверждается путем оценки репликации вирусов в легких мышей. Электронно-микроскопические исследования показали очевидные морфологические изменения в мутантах по сравнению с «диким» А/WSM/33. Мутанты

имели преимущественно нитчатые структуры вирионов. Отмечались дефекты в процессе бутонизации и формирования вирусных частиц. Структура гемагглютинаина обладала низкой электронно-оптической плотностью, распределялась хаотично либо полностью отсутствовала.

Заключение. Полученные результаты отображают уникальную функцию мутировавших аминокислотных остатков в М1 гене и поддерживают гипотезу, что выбранные α -спирали взаимодействуют с мембраной вируса. Отдельные области активных центров М1 белка играют решающую роль в процессе сборки вируса и в отношении между М1 и морфологией вируса.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю д.м.н. Маркушину С.Г., к.б.н. Цфасман Т.М. за постановку темы, обучению в ходе работы, за ценные советы и обсуждение результатов.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ миРНК ПРОТИВ ГЕНОВ IL-4 И IL-13 ЭФФЕКТИВНО ПОДАВЛЯЮТ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬ БРОНХОВ И АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ В ЛЕГКИХ НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Сундукова М.С., Шиловский И.П., Гайсина А.Р., Хаитов М.Р.

*Лаборатория противовирусного иммунитета
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России*

Введение. Аллергическая бронхиальная астма (БА) является одним из самых распространенных хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей. IL-4 и IL-13 играют ключевую роль в патогенезе БА. Они индуцируют синтез IgE, инфильтрацию эозинофилов в ткань легких, и повышение гиперреактивности дыхательных путей, что делает данные цитокины перспективными мишенями для создания новых противоастматических препаратов. РНК-интерференция представляет собой новый подход к регуляции генной экспрессии с использованием молекул малых интерферирующих РНК (миРНК). Поэтому целью данного исследования было оценить эффективность подавления экспрессии генов IL-4 и IL-13 молекулами миРНК на мышинной модели БА.

Материалы и методы. Самки мышей BALB/c были разделены на 6 групп. Группы 1-5 иммунизировали внутрибрюшинным введением OVA (20 мкг/мышь), эмульгированного в Al(OH)₃ (2 мг/мышь) в 0, 14 и 28 дни эксперимента. Провокации путем интраназального (и/н) введения 1% OVA (50мкл/мышь) проводились в 42-44 дни. Группа 3 получала и/н миРНК против IL-4 (siIL-4) в дни 41-44 в общей дозе 120 мкг/мышь. Группа 4 получала ту же дозу миРНК против IL-13 (siIL-13) и группа 5 – смесь siIL-4/siIL-13. Группа 2 (отрицательный контроль) получала ту же дозу миРНК против гена GFP. Группа 1 не получала миРНК. Группа 6 никаким манипуляциям не подвергалась. Измерялись уровни сывороточных OVA-специфических IgE, IgG1, IgG2a антител методом ELISA. Гиперреактивность дыхательных путей (ГРБ) измерялась с помощью неинвазивной плетизмографии на 45 день. Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) собирали на 46 день и анализировали с помощью световой микроскопии. Левое легкое отбирали для гистологического анализа, правое – для анализа генной экспрессии методом ПЦР.

Результаты. У мышей, получавших siIL-4, siIL-13 и их смесь уровни OVA-специфических IgE, IgG1, IgG2a не изменялись по сравнению с мышами, получавшими siGFP. У мышей, получавших смесь siIL-4/siIL-13 наблюдалось 21% снижение ГРБ в сравнении с мышами 2 группы. Мыши, получавшие siIL-4 показали 25% снижение эозинофилии в БАЛ в сравнении с мышами, получавшими siGFP. Введение siIL-13 и смеси siIL-4/siIL-13 показало еще большее снижение эозинофилии в БАЛ: на 63% и 62% соответственно. Гистологический анализ ткани легких показал снижение аллергического воспаления в группах, получавших siIL-13 и смеси siIL-4/siIL-13 в сравнении с 2 группой.

Заключение. Наибольшее снижение ГРБ и аллергического воспаления в легких происходило при одновременном подавлении обоих генов мишеней IL-4 и IL-13 синтетическими молекулами мiРНК, что может быть перспективным подходом к разработке новых противоастматических препаратов.

ГИПЕРДИАГНОСТИКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ АЛЛЕРГИИ – КАК ИЗБЕЖАТЬ?

Хлудова Л.Г., Мясникова Т.Н.

*Отделение иммунопатологии взрослых
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России*

Введение. Лекарственная аллергия является важной междисциплинарной проблемой, затрагивающей интересы не только врачей аллергологов-иммунологов, но и специалистов других медицинских специальностей. Низкая осведомленность не только пациентов, но и врачей, малое количество объективных исследований в данной области в сочетании с большими объемами недостоверных данных (как в специализированной литературе, так и в средствах массовой информации) приводят к гипердиагностике лекарственной аллергии. Анализ причин необоснованных подозрений на лекарственную аллергию позволяет избежать бездоказательных запретов на применение важных для пациента лекарственных препаратов.

Материалы и методы. Ретроспективный анализ амбулаторных карт пациентов, обратившихся в отделение иммунопатологии Института Иммунологии с 2013 по 2016 г.г. с жалобами на лекарственную аллергию. Разбор клинического случая из практики.

Результаты: проанализирован 181 случай обращения на консультацию к врачу аллергологу-иммунологу с жалобами на лекарственную аллергию. У 31 пациента (17,1%) наблюдались неспецифические жалобы и 30 пациентов (16,5%) испытывали страх развития перекрестных реакций между несвязанными между собой группами препаратов. Никогда не отмечали симптомов лекарственной непереносимости и обратились с профилактической целью по рекомендации врачей 14 пациентов (7,7%). Предоставили ложноположительные результаты тестирования *in vitro*, на основании которых лечащие врач отказывали им в проведении лечения 8 пациентов (4,4%). Таким образом, в 37,6% обращений (у 68 пациентов) уже при амбулаторном приеме с уверенностью можно было утверждать об отсутствии лекарственной аллергии.

Несмотря на большое число необоснованных обращений, в некоторых случаях под симптомами лекарственной аллергии скрывались серьезные заболевания, например системный мастоцитоз, клинический случай которого будет представлен в презентации.

Заключение. Гипердиагностика лекарственной аллергии приводит к отказу от проведения необходимого пациенту лечения и может маскировать тяжелую патологию, такую как системный мастоцитоз. Причинами гипердиагностики являются неспецифический характер симптомов, страх пациентов, ранее перенесших реакцию на лекарственный препарат перед приёмом препаратов других групп, фармакологическая неграмотность врачей и необоснованное использование лабораторных методов диагностики.

Благодарности. Романовой Т.С., к.м.н. Мясниковой Т.Н., зав отделением проф д.м.н. Латышевой Т.В.

ИНДУКЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ФИБРОБЛАСТОВ ПРЕПАРАТОМ «ГЕПОН»

Чулкина М.М., Холмухамедов Э.Л., Атауллаханов Р.И.

*Лаборатория активации иммунитета
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России*

Введение. Иммуномодулирующий препарат Гепон является пептидом (14а.к.), последовательность гомологична шарнирной области белка эзрина. Препарат эффективно

применяется в клинической практике для лечения незаживающих язв слизистых, кожи и мягких тканей. Механизм заживляющего действия до настоящего времени не установлен. В данной работе изучено влияние Гепона на фибробласты, являющиеся ключевым участником процессов заживления и регенерации. Исследовали влияние Гепона на пролиферацию и дифференцировку, а также на ряд других характеристик, в сравнении с естественным активатором фибробластов- TGF β 1.

Материалы и методы. Работа проводилась на фибробластах 3T3-NIH. Морфологию клеток оценивали методом конфокальной микроскопии. Активацию протеинкиназ АКТ и ERK1/2 измеряли методами флуоресцентной микроскопии, вестерн-блоттинга. Транскрипцию генов *α -sma*, *colla1*, *tgf- β 1* измеряли методом RT-PCR. Прижизненной микровидеосъемкой проводили измерение скорости заживления «дефекта» в монослое фибробластов (scratch test). Пролиферации оценивали по скорости включения ³H-тимидина в ДНК.

Результаты. Показана дифференцировка фибробластов 3T3-NIH в миофибробласты под действием препарата Гепон. Основной показатель дифференцировки - de novo синтез α -smooth muscles actin и образование микрофиламент с его включением. Установлено, что в фибробластах, активированных TGF β 1, усилена транскрипция генов, связанных с дифференцировкой - *α -sma*, *colla1*, *tgf- β 1*, в то время как под действием Гепона достоверно усиливается только транскрипция гена *α -sma*. TGF- β 1 дозозависимым образом стимулировал пролиферацию клеток 3T3-NIH, а Гепон не влиял на этот процесс. В модели scratch test Гепон достоверно повышал скорость движения монослоя, а TGF- β 1 не оказывал влияния на этот показатель.

Исследовано влияние препарата на активацию сигнальных путей Raf/MEK/ERK и PI3K/Akt(ПКВ) в фибробластах 3T3-NIH. Показано, что Гепон вызывает фосфорилирование ERK1/2 и АКТ, так же, как TGF- β 1. При действии обоих активаторов происходит транслокация ERK1/2 в ядро.

Заключение. Препарат Гепон вызывает активацию сигнальных путей ERK и АКТ в фибробластах 3T3-NIH с последующей дифференцировкой по ключевому признаку этого процесса – транскрипции гена *α -sma* и образованию α SMA-микрофиламент. Влияние Гепона на фибробласты подобно, но не идентично TGF β 1. Полученные данные раскрывают не известные ранее молекулярные механизмы заживляющего действия препарата Гепон, которое давно описано клиницистами при лечении различных язв и ран.

ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИИ НА ЯД ПЧЕЛ

Шабанов Д.В., Мартынов А.И., Федоскова Т.Г.

*Лаборатория молекулярных механизмов аллергии
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России*

Введение. Современная классификация относит инсектную аллергию (ИА) к неатопической IgE-опосредованной гиперчувствительности (ГЧ). Значимость проблемы ИА обусловлена невозможностью прогнозирования контактов с насекомыми, выраженностью и тяжестью клинических симптомов, а также отсутствием единых подходов к диагностике и лечению данной патологии. Распространенность ИА к жалящим насекомым (ЖН) в России составляет 0,4–8%. По данным зарубежных авторов выраженные местные реакции на ужаления ЖН встречаются в 2,4–26,4% общей популяции населения. Системные реакции выявлены у 0,5–3,3% обследованных жителей в США, и 0,3–7,5% жителей Европы. Смертность от анафилаксии на яд пчел составляет 0,03–0,48 случая на миллион населения ежегодно. В практике не редки случаи, когда у пациента с положительным инсектным анамнезом, при обследовании, отсутствуют спец. IgE к яду пчел, или их значения крайне низки. В литературе подобные случаи описываются, как неаллергическая ГЧ.

Целью нашей работы является исследование подобных случаев, и поиск

диагностических подходов к данной проблеме.

Материалы и методы. Из 94 больных с анамнестическими данными на ГЧ к ужалению ЖН, отобрана группа (18 пациентов) с убедительными данными о реакциях ГЧ на яд пчел. Проведено обследование с использованием стандартных тестов на наличие специф. IgE и исследование клеточного звена (CD63+, CD203c, LTC4, сыв. триптазы), а также использованы методы молекулярной аллергодиагностики (МА) ImmunoCAP.

Результаты. При обследовании в 55,5% случаев не выявлено повышенного уровня общего IgE. Так же у 11 пациентов не обнаружены спец.IgE к яду пчел. Исследования методом МА выявили сенсibilизацию у 9 пациентов. При исследовании клеточного звена, во всех случаях выявлена неспецифическая активация базофилов (CD203c), у 9 пациентов с IgE- сенсibilизацией на яд пчел выявлена специфическая активация базофилов (CD63+), и у 3 пациентов с негативными спец.IgE выявлена специфическая активация базофилов, что подтверждает IgE характер реакций.

Заключение. На основании полученных данных выявлено, что в данном исследовании, только в 50% случаев выявлены положительные спец.IgE к яду пчел, исследование клеточной активности позволяет получить данные об IgE-опосредованной ГЧ, при отсутствии значимых титров IgE. А также выявить случаи неIgE опосредованной ГЧ.

Благодарности. Научным руководителям Мартынову А.И. и Федосковой Т.Г. а также сотрудникам лаборатории молекулярных механизмов аллергии, и особенно проф. Федосевой В.Н. и Миславскому О.В.

РЕПЛИКАЦИЯ МУТАНТНОГО ПО АКССОРНЫМ ГЕНАМ ВИЧ-1 В УСЛОВИЯХ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ ТРАНСМИССИИ И ИНФЕКЦИИ СВОБОДНЫМ ВИРУСОМ

Шунаева А.А., Мазуров Д.В.

Лаборатория иммунохимии

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Введение. К факторам рестрикции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) относят клеточные белки, которые препятствуют репликации вируса после его вхождения в клетку. Можно насчитать несколько десятков различных клеточных факторов с противовирусной активностью, однако специфичными для ВИЧ являются шесть основных семейств белков – APOBEC, TRIM, Tetherin, SAMHD и MX2. С другой стороны, ВИЧ выработал ряд собственных белков (Vif, Vpr, Vpr, Vpx, Nef), которые противодействуют клеточным факторам рестрикции и нивелируют их эффекты. Роль рестрикторных факторов подробно исследована при заражении свободным вирусом. Тем не менее, инфекция ВИЧ, передаваемая непосредственно из клетки в клетку, является значительно более эффективным способом распространения вируса в организме. Однако в данных условиях рестрикторные факторы не были изучены в должной мере.

Результаты. В процессе данной работы мы создали ВИЧ-1 конструкции, дефектные по генам Vif, Vpr, Vpr, Nef, и оценили уровень репликации дефектных вирусов в тесте межклеточной инфекции и инфекции свободным вирусом. В экспериментах были использованы разные типы клеток в качестве продуцентов вирусных частиц и мишеней. Количественную оценку инфекции проводили с помощью усовершенствованных векторов, экспрессия которых зависит от репликации вируса (Shunaeva A et al. J Virol. 2015 Oct 15;89(20):10591-601). Влияние делеции каждого из акссорных белков было разным в зависимости от того, какие клеточные линии были задействованы, а также от того, какой способ передачи вируса моделировался. Так, в экспериментах на лимфоидных клетках наблюдались различия в уровне репликации дефектного вируса по сравнению с диким типом, тогда как на НЕК 293Т клетках эти различия оказывались незначительными. Это

обусловлено тем, что в лимфоидных клетках экспрессируется широкий спектр рестрикционных факторов к ВИЧ-1.

При инфекции свободным вирусом дефектный вирус заражал клетки-мишени до десяти раз менее эффективно, чем вирус дикого типа, тогда как в условиях сокультивирования клеток снижение уровня инфекции не было столь сильным (в 1,5 раза). Таким образом, межклеточная трансмиссия способствует нивелированию эффекта, вызванного делецией аксессуарных генов вируса.

Заключение. Итак, наши данные указывают на то, что межклеточная трансмиссия ВИЧ способствует усилению репликации вируса, дефектного по одному из аксессуарных генов, и может служить дополнительным механизмом противодействия ВИЧ клеточной рестрикции.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность заведующему лаборатории иммунохимии, д.б.н. Филатову А.В., и к.м.н. Мазурову Д.В., под чьим руководством была проделана работа.

Оглавление:

РОЛЬ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ В ТЕЧЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ АССОЦИИРОВАННОЙ С ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ Агаева М.И., Савченко Т.Н.....	3
АКТИВАЦИЯ TLR-АГОНИСТАМИ ДВУХ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ МЕХАНИЗМОВ В ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ Багаев А.В., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И.....	3
ВОПРОСЫ ЭКСТРАПОЛЯЦИИ НА ЧЕЛОВЕКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ПОЛИОКСИДОНИЯ Банюк Е.В., Смирнова А.С.....	5
ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ И ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ВОДРАСТВОРИМОГО Фуллерена C60 Барабошкина Е.Н., Шершакова Н.Н., Шабанова Д.Д., Андреев С.М., Хаитов М.Р.....	5
ВЛИЯНИЕ ОЖИРЕНИЯ НА ТЕЧЕНИЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ Глушкова Е.Ф., Шартанова Н.В.....	6
СОЗДАНИЕ НОВОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ CRISPR-CAS9 ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МУРАМИЛПЕПТИДОВ Дагиль Ю.А., Арбатский Н.П., Мазуров Д.В., Львов В.Л., Пашенков М.В.....	7
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОФОРМ ЛИМФОЦИТАРНОГО ФОСФАТАЗО-АССОЦИИРОВАННОГО ФОСФОПРОТЕИНА Круглова Н.А., Мешкова Т.Д.....	8
АЛЛЕРГЕННОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ МОДИФИЦИРОВАННОГО ЭКСТРАКТА ИЗ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ DERMATORHAGOIDES PTERONYSSINUS Ласкин А.А., Андреев С.М., Бабахин А.А.....	9
МЕХАНИЗМЫ УСИЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНА В СОСТАВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА В АНТИГЕН-ПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ Лебедева Е.С., Багаев А.В., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И.....	9
ВЛИЯНИЕ ВОДНОЙ ДИСПЕРСИИ Фуллерена C60 НА АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ Макарова Э.А., Шершакова Н.Н., Андреев С.М., Хаитов М.Р.....	10
НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО ОТЕКА (НАО) I И II ТИПА Мартынова И.А., Латышева Е.А., Латышева Т.В.....	11
ИДЕНТИФИКАЦИЯ САЙТОВ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ЛИМФОЦИТАРНОГО ФОСФАТАЗО-АССОЦИИРОВАННОГО ФОСФОПРОТЕИНА Мешкова Т.Д., Круглова Н.А.....	12

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРИЗМА ГЕНОВ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ С РАЗВИТИЕМ ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ С ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМОЙ Платунова М.С., Каплунова М.Ю., Борисов В.С., Абрамов В.Ю.....	12
НОВЫЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ УРОВНЯ вкДНК В ДИАГНОСТИКЕ КРИЗА ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА Родионов А.А., Кофиади И.А., Абрамов В.Ю., Алексеев Л.П.....	13
ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ХОЛЕСТЕРИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ МАТРИКСНОГО БЕЛКА В СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ВИРУСА ГРИППА А/WSN/33 Синявин А.Э., Кост В.Ю., Цфасман Т.М., Маркушин С.Г.....	14
СИНТЕТИЧЕСКИЕ миРНК ПРОТИВ ГЕНОВ IL-4 И IL-13 ЭФФЕКТИВНО ПОДАВЛЯЮТ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ И АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БРОНИХИАЛЬНОЙ АСТМЫ Сундукова М.С., Шиловский И.П., Гайсина А.Р., Хайтов М.Р.....	15
ГИПЕРДИАГНОСТИКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ АЛЛЕРГИИ – КАК ИЗБЕЖАТЬ? Хлудова Л.Г., Мясникова Т.Н.....	16
ИНДУКЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ФИБРОБЛАСТОВ ПРЕПАРАТОМ «ГЕПОН» Чулкина М.М., Холмухамедов Э.Л., Атауллаханов Р.И.....	16
ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИИ НА ЯД ПЧЕЛ Шабанов Д.В., Мартынов А.И., Федоскова Т.Г.....	17
РЕПЛИКАЦИЯ МУТАНТНОГО ПО АКССОРНЫМ ГЕНАМ ВИЧ-1 В УСЛОВИЯХ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ ТРАНСМИССИИ И ИНФЕКЦИИ СВОБОДНЫМ ВИРУСОМ Шунаева А.А., Мазуров Д.В.....	18