

Сервули Екатерина Александровна

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА
70КДА ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ
ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРУЕМОЙ
ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ**

14.03.08 – авиационная, космическая и морская медицина

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва, 2019г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медикобиологических проблем Российской академии наук.

Научный руководитель: кандидат медицинских наук, Пономарев Сергей Алексеевич, заведующий Лабораторией физиологии иммунной системы Государственного научного центра Российской Федерации - Института медико-биологических проблем РАН.

Научный консультант: кандидат биологических наук, Шевченко Марина Александровна, научный сотрудник Лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор, Кофиади Илья Андреевич, заведующий Лабораторией молекулярной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России (ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России),

доктор медицинских наук, Анна Павловна Топтыгина, ведущий научный сотрудник Лаборатории цитокинов Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора).

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет).

Защита диссертации состоится «___» _____ 201__ г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.111.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ – ИМБП РАН) по адресу: 123007 г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ РФ – ИМБП РАН и на сайте <http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/Science/DisserSov/Servuly/Servuly-dis.pdf>
Автореферат разослан «___» _____ 201__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

С.В. Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Космическая иммунология является одной из активно развивающихся отраслей науки. С увеличением продолжительности космических полетов особенно актуальным становится вопрос поддержания нормальной работоспособности различных систем организма космонавтов, в том числе и иммунной системы. В условиях космического полета (КП) наблюдается снижение функциональной активности и адаптивных возможностей иммунной системы (Dhabhar F.S., 2009, Пономарев С.А., Рыкова М.П. и др., 2011, Моруков Б.В., Рыкова М.П. и др., 2013), изменение цитокинового профиля в сторону экспрессии провоспалительных цитокинов, а также КП оказывает влияние на антиген-специфическую толерантность (Morukov B., Rykova M. et al., 2011, Mehta S.K., Crucian B.E. et al., 2013, Novoselova E.G., Lunin S.M. et al., 2015, Globus R.K. Morey-Holton E., 2016), что может привести к увеличению риска возникновения инфекционных и аллергических заболеваний. Кроме того, при истощении иммунной системы возникает опасность развития латентного про-аллергического ответа. При проведении аллергологического обследования космонавтов после КП было выявлено появление признаков сенсибилизации к различным аллергенам (Konstantinova I.V., 1991, Рыкова М.П., Герцик Ю.Г. и др., 2006). Кроме того, была отмечена активация в период КП имевшейся ранее сенсибилизации к бактериальным аллергенам. Очевидно, что опасность возникновения сенсибилизации возрастает с увеличением продолжительности полета за счет снижения иммунологической резистентности и ежедневного воздействия микропримесей в атмосфере корабля, которые являются потенциальными аллергенами. Кроме того, нельзя не принимать во внимание влияние микробного загрязнения станции и роста потенциала патогенности консументальной микрофлоры человека (Константинова И.В., 1988, Мешков Д.О., 2001).

Иммунная дисрегуляция наблюдалась у космонавтов и астронавтов не только в послеполетный период, но и непосредственно во время космических миссий, как длительных (Crucian B., Vabiak-Vazquez A. et al., 2016), так и краткосрочных (Crucian B., Stowe R. et al., 2013). При анализе данных о заболеваемости во время полетов на борту Международной Космической Станции, продолжительностью несколько месяцев, 46% членов экипажа отмечали возникновение выраженных клинических симптомов, требовавших медицинского вмешательства, среди которых наиболее часто встречались различные кожные высыпания, инфекционные заболевания (риниты, фарингиты, кожные инфекции и т.д.), атипичные аллергические проявления и герпес. Еще 37% отмечали появление слабо выраженных нарушений и лишь 17% не отмечали возникновения проблем со здоровьем. Наибольшая доля нарушений, связанных с иммунной дисрегуляцией, проявлялась в виде различных кожных высыпаний (23 события из 70), за которыми следовали симптомы респираторных нарушений (20 событий из 70). Кроме того, отмечались случаи возникновения гиперчувствительности (2 случая) (Crucian B., Vabiak-Vazquez A. et al., 2016). В связи с этим, изучение проблемы сенсибилизации организма к аллергенам различной природы, а также разработка новых подходов к профилактике, диагностике и лечению аллергических заболеваний у человека, живущего и работающего в условиях КП, является актуальной задачей.

Аллергическое воспаление дыхательных путей (АВДП) – одно из наиболее распространенных заболеваний, частным случаем которого является аллергическая бронхиальная астма. Наиболее частые проявления АВДП: инфильтрация дыхательных путей воспалительными клетками, бронхоспазм, заполнение просвета бронхов секретом, а также отек и гиперемия бронхов. В большинстве случаев АВДП поддается контролю путем применения комбинации кортикостероидных препаратов, подавляющих симптомы воспаления, и бета-2-селективных адреномиметиков длительного действия, которые снимают бронхоспазм путем воздействия на гладкие мышцы бронхов. Однако встречаются случаи резистентности заболевания к применению кортикостероидов. Кроме того, зачастую ассоциированные с АВДП осложнения в результате присоединения бактериальных, вирусных инфекций или ингаляции патогенов грибной природы требуют срочной госпитализации пациентов. В условиях КП это затруднительно и требует экстренной

эвакуации космонавта, а в длительных космических миссиях, в том числе к другим планетам, практически неосуществимо (Morukov B., Rykova M. et al., 2011). Поэтому необходимо разработать подходы купирования развития заболевания на ранних этапах, до возникновения выраженных клинических проявлений. Поскольку АДП фенотипически гетерогенное нарушение, обусловленное совокупностью внешних воздействий и генетических особенностей, определение факторов риска возникновения заболевания затруднено. Дальнейшие исследования необходимы для усовершенствования диагностики, выяснения причин и поиска путей предупреждения развития АДП (Garbuz D.G., Yushenova I.A. et al., 2011, Renz H., 2011, Binia A. Kabesch M., 2012, Custovic A. Simpson A., 2012, Dapul-Hidalgo G. Bielory L., 2012, Yang I.V. Schwartz D.A., 2012).

В последние годы все больше внимания исследователей привлекает циркулирующий пул внеклеточной формы белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70), присутствующий в сыворотке периферической крови как лабораторных животных, так и человека (Pockley A.G., Shepherd J. et al., 1998, Johnson J.D. Fleshner M., 2006). Было показано, что при некоторых заболеваниях, в том числе АДП, в периферической крови увеличивается количество сывороточных циркулирующих белков БТШ70 и антител к ним (Pittet J.F., Lee H. et al., 2002, Pockley A.G., De Faire U. et al., 2002, Ganter M.T., Ware L.B. et al., 2006, Ogawa K., Seta R. et al., 2011, Cramer R., 2012, Jenei Z.M., Szeplaki G. et al., 2013), а также было показано увеличение экспрессии белков теплового шока у мышей во время КП (Novoselova E.G., Lunin S.M. et al., 2015). Установлено также, что внеклеточный пул белков БТШ70 обладает уникальными иммуномодулирующими свойствами, стимулируя как врожденный, так и адаптивный иммунитет, значительно усиливая сопротивляемость организма к патогенам.

Вышеописанные свойства дают основание предположить участие БТШ70 в естественной регуляции воспалительных процессов, в том числе АДП. Исследование возможности модуляции аллергического ответа в дыхательных путях под действием БТШ70 актуально для экспериментальной и практической медицины, в том числе для авиакосмической медицины. Изучение механизмов регуляторного воздействия БТШ70 при индукции АДП необходимо для разработки лекарственных препаратов, подходящих для применения во время длительных КП.

Цель работы:

Целью данной работы является исследование защитных свойств БТШ70 при индуцированном аллергическом воспалении дыхательных путей мышей во время антиортостатического вывешивания.

Задачи исследования:

1. Разработать модель аллергического воспаления дыхательных путей, совмещенную с моделью антиортостатического вывешивания.
2. В модели аллергического воспаления дыхательных путей сравнить показатели локального клеточного иммунного ответа в условиях нормальной нагрузки и антиортостатического вывешивания.
3. Определить характер системного и локального гуморального ответа при развитии аллергического воспаления дыхательных путей в условиях моделируемой гравитационной разгрузки.
4. Исследовать возможные побочные эффекты: развитие аутоиммунных и аллергических реакций при длительном введении БТШ70 мышам.
5. Оценить способность БТШ70 подавлять индуцированное воспаление дыхательных путей в условиях моделируемой гравитационной разгрузки.
6. Исследовать роль АТФ-азной и шаперонной активностей БТШ70 в подавлении аллергического воспаления дыхательных путей.

Научная новизна

Впервые была подобрана оптимальная модель АДП, подходящая для моделирования гравитационной разгрузки, как на этапе индукции системного, так и локального аллергического ответа. Были показаны особенности иммунного ответа в условиях 23-суточного антиортостатического вывешивания. В частности, обнаружили что интенсивность клеточного ответа выражена в меньшей степени, чем в условиях нормальной опорной нагрузки. При этом интенсивность системного гуморального ответа сопоставима в условиях опорной разгрузки и нормальной нагрузки, а локальный гуморальный ответ носит провоспалительный характер.

Впервые было показано, что относительный недостаток внеклеточного БТШ70 является одной из причин развития воспаления. Проаллергические свойства этого протеина не выявлены. При длительном введении БТШ70 не обладает иммуногенностью.

Впервые было показано, что локальное применение БТШ70 в острой фазе воспаления в условиях антиортостатического вывешивания ограничивало приток эозинофилов в легкие и снижало уровень аллерген-специфических иммуноглобулинов как локально, так и на системном уровне.

Впервые охарактеризована способность белка БТШ70 ингибировать хемотаксис дендритных клеток (ДК) в ответ на АТФ, причем ингибиторный эффект основан на АТФ-азной активности БТШ70.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные подтверждают протективную активность пула внеклеточных белков БТШ70 при АДП как в условиях нормальной опорной нагрузки, так и при моделировании эффектов микрогравитации, и несут очевидную значимость как для фундаментальной биологии, так и для экспериментальной и практической медицины. Установлена динамика секреции БТШ70 в процессе развития АДП, а также механизм подавления этими белками хемотаксической активности ДК при миграции в очаг воспаления.

Продемонстрированный в данной работе характер изменений иммунного ответа при моделировании условий КП обосновывает возможную необходимость проведения углубленного мониторинга некоторых показателей иммунного статуса перед длительными космическими миссиями для уменьшения риска развития АДП.

Дальнейший поиск способов регуляции уровня продукции и секреции БТШ70 в различных тканях, а также поддержания общего циркулирующего в организме внеклеточного пула БТШ70 необходим для успешной терапии многих воспалительных заболеваний, в том числе и АДП. Не обладающие аллергенными и иммуногенными свойствами высокомолекулярные белки семейства БТШ70, обладающие АТФ-азной и шаперонной активностью, а также минимальным количеством побочных эффектов, можно рассматривать как основу для создания универсальных противоаллергических вакцин, подходящих для использования в длительных КП.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработанная модель аллергического воспаления дыхательных путей, совмещенного с антиортостатическим вывешиванием, позволяет охарактеризовать особенности проявления аллергического воспаления дыхательных путей в условиях опорной разгрузки.
2. Применение БТШ70 способно подавлять аллергическое воспаление дыхательных путей в условиях моделируемой гравитационной разгрузки с отсутствием побочных реакций в случае необходимости длительного использования БТШ70.
3. Противовоспалительное действие БТШ70 частично обусловлено шаперонной и АТФ-азной активностями этого протеина, обеспечивающим препятствия процессам некроза и некроза мигрировавших в легкие нейтрофилов, и уменьшения концентрации провоспалительного медиатора – внеклеточного АТФ.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на научно-практических конференциях: 29th, 35th EAACI Congress (London, United Kingdom, 2010; Vienna, Austria, 2016), 10th EAACI GA²LEN Immunology Winter School (Åre, Sweden, 2012), 1st European Congress of Immunology (ECI, Glasgow, Scotland, United Kingdom, 2012), XLIII академических чтениях по космонавтике, посвященных памяти академика С.П.Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства «Королёвские чтения» (Москва, 2019).

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 7 статей в журналах из перечня ВАК РФ.

Результаты диссертационной работы обсуждались и рекомендованы к защите на заседании секции Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медикобиологических проблем Российской академии наук «Космическая физиология и биология» (протокол № 2 от 26 февраля 2019 года).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-01028/16.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований, обсуждения, выводов, благодарностей, списка литературы. В диссертации приведены 2 таблицы и 41 рисунок. Список использованной литературы содержит 25 отечественных и 222 зарубежных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования

В работе были использованы самки мышей линии BALB/c, в возрасте 10-12 недель, весом 18-20 г. Экспертиза протоколов исследований проводилась Комиссиями по биомедицинской этике ГНЦ – РФ ИМБП РАН (протокол № 497 от 03.07.2018) и ИБХ РАН (протокол № 179/2015 от 21.07.2015).

Таблица 1. Объем исследований

	Этап эксперимента	Количество групп
1	Сравнение краткосрочной и длительной моделей	2 серии по 3 группы мышей (3+4 мыши/группу) = 21 мышь
	Сравнение моделей с аллергеном разной степени очистки	3 группы по 5 мышей = 15 мышей
	Анализ особенностей АДП в условиях вывешивания	4 группы по 7 мышей = 28 мышей
2	Оценка динамики секреции БТШ70 и АТФ во внеклеточное пространство при АДП	5 групп по 5 мышей = 25 мышей
3	Анализ иммуногенности	3 группы по 5 мышей = 15 мышей
	Анализ аллергенности	5 групп по 5 мышей = 25 мышей
4	Влияние БТШ70 на развитие иммунного ответа при АДП в условиях вывешивания	2 группы по 7 мышей = 14 мышей (+3 группы из этапа 3)
5	Анализ влияния БТШ70 на процессы гибели в популяции нейтрофилов при АДП	биоматериал из этапа 2
	Анализ влияния БТШ70 на хемотаксис дендритных клеток	биоматериал из этапа 2

Структура исследования

Исследование состояло из нескольких этапов (Табл. 1). На 1 этапе проводили разработку модели АДП, совмещенной с вывешиванием. Было проведено сравнение краткосрочной и длительной моделей АДП в условиях нормальной опорной нагрузки, затем сравнение параметров выбранной краткосрочной модели с использованием аллергена различной степени очистки. Затем проводили индукцию АДП при помощи выбранной модели с использованием аллергена выбранной степени очистки в условиях вывешивания. На 2 этапе проводилось изучение роли БТШ при АДП в условиях нормальной нагрузки. Была выполнена оценка динамики секреции БТШ70 и АТФ во внеклеточное пространство, а также анализ соотношения БТШ70:АТФ на разных этапах развития АДП. На 3 этапе выполняли исследование возможных побочных эффектов БТШ70, а именно анализ аллергенности и иммуногенности экзогенно вводимого БТШ70. На 4 этапе проводили оценку влияния БТШ70 на развитие иммунного ответа при АДП в условиях вывешивания посредством анализа изменения клеточного и гуморального ответа при введении БТШ70 в острой фазе развития воспаления. На 5 этапе выполняли изучение механизмов действия БТШ70: проводили анализ влияния БТШ70 на процессы гибели в популяции нейтрофилов при АДП и на хемотаксис дендритных клеток.

Материалы и методы исследования

Модель овалбумин-индуцированного АДП: включала внутрибрюшинные введения белка овалбумина (ОВА) в концентрации 10 мкг/мышь с адьювантом Imject Alum на 0, 14, 21 день в случае длительной модели, на 0 и 7 день в случае краткосрочной модели, с последующими интрафарингеальными ингаляциями 0,1% раствора ОВА в фосфатном буфере (ФБ) в дозе 50 мкл/мышь на 27, 28 день в случае длительной модели, на 19, 20, 21 день в случае краткосрочной модели. Выбор степени очистки аллергена (ОВА grade V и LPS free ОВА) проводили с использованием краткосрочной модели АДП.

Введение БТШ70 в дыхательные пути мышей проводили интрафарингеально в концентрации 20 мкг/мл, объеме 50 мкл через 24 часа после последней ингаляции аллергена.

Антиортогостатическое вывешивание проводили по методу Ильина-Новикова в модификации Морей-Холтон (Ильин Е.А., Новиков В.Е., 1980, Morey-Holton E., Globus R.K. et al., 2005), продолжительность вывешивания составляла 23 суток.

БТШ70-индуцированное воспаление дыхательных путей вызывали внутрибрюшинными инъекциями БТШ70, с адьювантом Imject Alum, на 0 и 7 день в концентрации 10 мкг/мышь с последующим интрафарингеальным введением на 19, 20 и 21 день 0,1% раствора БТШ70 в ФБ в дозе 50 мкл/мышь.

Индукция гуморального иммунного ответа на БТШ70: Выделенный из внутренних органов мышей белок БТШ70 вводили ежедневно (5 раз в неделю) внутрибрюшинно мышам той же линии в количестве 10 мкг/мышь в течение 7 недель.

Выделение БТШ70 из печени и почек мышей проводили методом афинной хроматографии на АТФ-агарозе (Sigma, США) с последующей очисткой от избытка АТФ диализом в ЭДТА-бикарбонатном буфере. Оценку чистоты БТШ70 проводили электрофорезом в полиакриламидном геле. Для определения гомогенности полученного БТШ70 проводили иммуноблоттинг с использованием антител BRM220 (Sigma, США).

Определение количества и состава клеток бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) проводили при помощи камеры Горяева (Минимед, Россия), набора для дифференциального окрашивания «Диахим-Диффквик» (Диахим, Россия) и стереомикроскопа (Zeiss, Германия).

Определение цитокинов в БАЛ и сыворотке периферической крови мышей проводили проточной цитометрией с использованием LEGENDplex Mouse Th Cytokine Panel (Biolegend, США) и иммуноферментным анализом (ИФА): IL-4 и IL-5 с помощью ELISA MAX Standard Sets (Biolegend, США), IL-13 с использованием ELISA Development Kit (PeproTech, США).

Определение содержания общих и антиген-специфических иммуноглобулинов (Ig) в БАЛ и сыворотках периферической крови мышей проводили ИФА. Общий IgE определяли

при помощи ELISA MAX™ Standard Sets (Biolegend, США). Аллерген-специфические антитела определяли с использованием anti mouse IgG, IgE, IgA HRP (Phara-Mingen, США).

Определение концентрации внеклеточного БТШ70 в БАЛ мышей проводили ИФА при помощи набора (DuoSet IC, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA).

Определение уровня внеклеточного АТФ в БАЛ мышей проводили с помощью набора ENLITEN ATP Assay System (Promega, США).

Выделение нейтрофилов из костного мозга мыши проводили методом негативной селекции с использованием набора для магнитной сепарации Neutrophil Isolation Kit (mouse) (Miltenyi Biotec, США). Для определения нейтрофилов методом проточной цитометрии проводили окрашивание антителами против Ly6G (clone RB6-8C5), конъюгированными с FITC, и против CD11b, конъюгированными с PE-Cy5 (все антитела eBioscience, США). Процент Ly6G⁺CD11b⁺ клеток в образце нейтрофилов оценивали при помощи цитометра FACSCalibur (BD Biosciences, США).

Определение влияния БТШ70 на активацию нейтрофилов. Активацию нейтрофилов проводили фарбол-12-миристан-13-ацетатом (PMA) (Sigma, США) в диапазоне концентраций 0,005-50 μ M. БТШ70 добавляли в диапазоне концентраций 2nM – 0,2 μ M. Определение внеклеточного содержания нуклеиновых кислот производили при помощи SYTOXGreen (ThermoFisher, США) и флуориметра (Promega, США). Визуализацию проводили методом конфокальной микроскопии (Nikon C1, Япония) с окрашиванием Hoechst 33342, ActinGreen 488, ProLong Gold (все ThermoFisher, США).

Регистрацию спонтанного апоптоза в первичной культуре нейтрофилов проводили проточной цитометрией с помощью AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, США).

Исследование индуцированного хемотаксиса дендритных клеток (ДК), выращенных из костномозговых предшественников, проводилось на планшетах Transwell Permeable Support (Corning, США) с мембраной 5 μ m; концентрация ДК 100000 клеток/лунку. В качестве хемо-аттрактантов использовали АТФ (Sigma, США), АДФ (Sigma, США), БТШ70, контроль - ФБ. Индекс хемотаксической активности определяли как отношение количества клеток, мигрировавших в ответ на аттрактант к количеству, мигрировавшему в ответ на ФБ.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы статистической обработки GraphPad Prism версия 6.0 (GraphPad Software, США). С помощью критерия Levene оценивали однородность дисперсий выборок. Нормальность распределения данных в каждой из групп определяли с помощью критерия Shapiro-Wilk's. Для количественных данных использовали многофакторный дисперсионный анализ с уровнем значимости p-value < 0.05. В зависимости от поставленных задач и способа формирования групп для исследования, полученные данные подвергались анализу с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и t-критерия Стьюдента. В каждом случае различие значений при p<0.05 рассматривалось как достоверное. Статистические значения: * p \leq 0.05; ** p \leq 0.01; *** p \leq 0.001; ns – не достоверно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка мышечной модели индуцированного АВДП в условиях антиортостатического вывешивания

Поскольку не каждая из существующих мышечных моделей АВДП подходит для комбинирования с моделью антиортостатического вывешивания нижних конечностей, было необходимо выбрать оптимальную. Проводили сравнение ОВА-индуцированных моделей АВДП: длительной и краткосрочной. При увеличении количества введений аллергена и увеличении длительности модели отмечалось достоверное повышение общего количества клеток в БАЛ, что наблюдали в длительной модели по сравнению с краткосрочной (Рис. 1 А). При этом доля эозинофилов в длительной и краткосрочной модели достоверно не отличалась (Рис. 1 Б).

Общее количество клеток в БАЛ и доля эозинофилов в краткосрочной модели были достоверно выше, чем у контрольной группы мышей (Рис. 1 А, Б). На основе полученных данных был сделан вывод о том, что с учетом длительности описанных моделей и показателей локального клеточного ответа более предпочтительно использование краткосрочной модели АДП совместно с антиортостатическим вывешиванием.

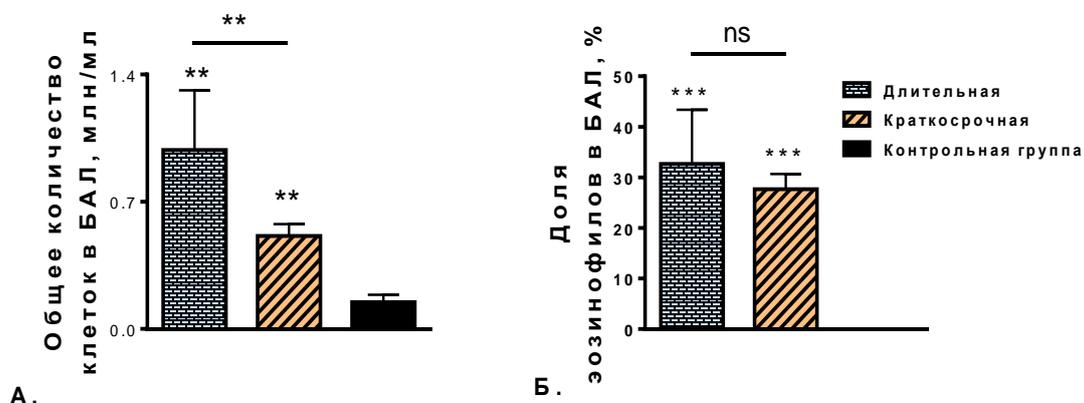


Рисунок 1. Сравнение длительной и краткосрочной моделей АДП у мышей: (А) Сравнение общего количества клеток в БАЛ (млн/мл). (Б) Оценка доли эозинофилов в БАЛ (%) (n = 5).

При подборе модели АДП было проведено сравнение ответа на ОВА различных степеней очистки: LPS free OVA и OVA grade V. При использовании LPS free OVA общее количество клеток было ниже, чем с использованием OVA grade V, и достоверно не отличалось от контрольной группы. Доля эозинофилов в модели с LPS free OVA была выше, чем в группе с OVA grade V, и достоверно выше, чем у контрольной группы. При этом абсолютное количество эозинофилов в группе LPS free OVA достоверно не отличалось по сравнению с группой с OVA grade V.

Модель АДП состоит из следующих этапов: индукция системного и локального ответа в дыхательных путях. Для оценки влияния опорной разгрузки на оба этапа АДП необходимо проводить вывешивание на весь период моделирования АДП, поскольку в этом случае будут созданы условия, максимально приближенные к условиям КП. Исходя из данных Yang T.Y. и соавт. (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015), а также учитывая данные о слабой выраженности клеточного ответа в исследованиях иммунной системы космонавтов и добровольцев (Leach C.S., Rambaut P.C. et al., 1974, Kimzey S.L., Johnson P.C. et al., 1976, Shevach E.M., 2002, Firan M., Dhillon S. et al., 2006), было принято решение о том, что целесообразно использовать модель с применением OVA grade V. Достоверное увеличение общего количество клеток в БАЛ по сравнению с контрольной группой необходимо для обеспечения возможности проведения оценки наличия и интенсивности воспаления в легких.

На основе проведенных экспериментов была разработана модель АДП в условиях моделируемой опорной разгрузки, которая включала опорную разгрузку длительностью 23 суток, в течение которой производили индукцию системного и локального иммунного ответа с применением OVA grade V.

Оценка особенностей воспалительного ответа у мышей в условиях антиортостатического вывешивания

Сравнение параметров клеточного ответа в дыхательных путях в условиях нормальной нагрузки и гравитационной разгрузки

При изучении особенностей иммунного ответа в условиях антиортостатического вывешивания проводили сравнение параметров клеточного ответа в легких мышей. Количественный анализ показал, что в отсутствие воспаления вывешивание не оказывало влияние на общее количество клеток в БАЛ по сравнению с контрольной группой (Рис. 2). В условиях опорной разгрузки инфильтрация лейкоцитов в дыхательные пути была достоверно выше, чем у мышей с вывешиванием без АДП, при этом она снижалась по сравнению с

группой с АДП без вывешивания (Рис. 2 А). Детальный анализ показал, доля нейтрофилов при воспалении в условиях вывешивания хотя и отличалась от этого показателя у мышей с АДП без вывешивания, но различия были не достоверны (Рис. 2 Б). Доля эозинофилов, являющихся основным признаком аллергического воспаления, в БАЛ мышей с индуцированным в условиях опорной разгрузки АДП была достоверно выше по сравнению с контрольной группой, но снижена по сравнению с долей эозинофилов у мышей с АДП, не подвергавшихся вывешиванию (Рис. 2 В). Частично это можно объяснить увеличением доли нейтрофилов в БАЛ. Таким образом, было показано, что в условиях моделируемой опорной разгрузки АДП характеризуется снижением притока лейкоцитов в дыхательные пути и менее выраженной эозинофилией.

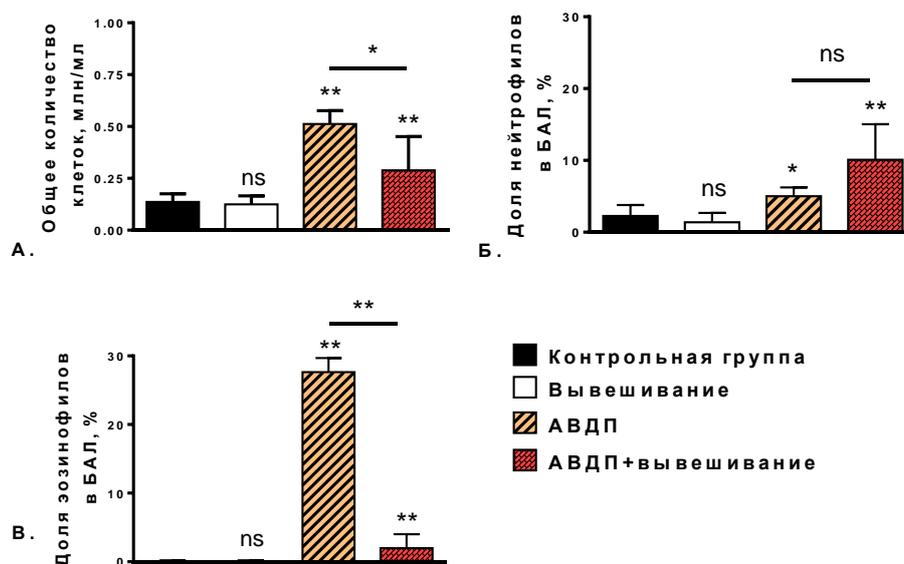


Рисунок 2. Влияние антиортостатического вывешивания на интенсивность АДП у мышей: (А) Сравнение общего количества клеток в БАЛ. (Б) Сравнение доли нейтрофилов, % и (В) эозинофилов в БАЛ, %, (7 мышей в группе). Сравнение производится между исследуемыми группами и контрольной группой (помечены звездочкой над столбцом), а также между исследуемыми группами (помечены крышками) – далее во всей работе.

В исследованиях Jang T.Y. и соавт. (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015) также получили менее выраженную эозинофилию в БАЛ мышей с АДП в условиях 2-недельного антиортостатического вывешивания по сравнению с мышами с АДП в отсутствие вывешивания. Однако, при изучении гистологической картины легких мышей с АДП в условиях вывешивания, авторы обнаружили массовую инфильтрацию легочной ткани эозинофилами и нейтрофилами. Более того, перибронхиальная и легочная инфильтрация воспалительными клетками была значительно сильнее, чем в группе мышей с АДП в условиях нормальной гравитационной нагрузки. Эти данные свидетельствуют о возможности латентного течения аллергического воспалительного ответа, при котором значительные морфологические изменения сопровождаются слабо выраженными клиническими проявлениями, а также о необходимости более глубокого изучения характера изменений при развитии АДП в условиях гравитационной разгрузки.

Сравнение системного иммуноглобулин-опосредованного про-аллергического гуморального ответа при развитии АДП в условиях нормальной нагрузки и гравитационной разгрузки

Для определения особенностей формирования про-аллергического иммунного ответа в условиях вывешивания проводилось сравнение системного IgE-опосредованного гуморального ответа в сыворотках периферической крови мышей. Было показано, что вывешивание не влияет на уровень общего IgE. При индукции АДП в условиях

вывешивания отмечалось достоверное увеличение уровня общего IgE по сравнению с контрольной группой. Сравнение системного гуморального ответа при моделировании АДП в условиях нормальной нагрузки и в условиях опорной разгрузки не выявило достоверных отличий в уровнях продукции общего IgE (Рис. 3).

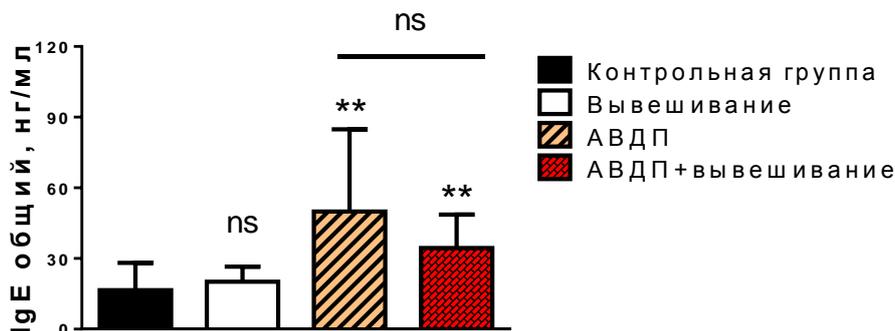


Рисунок 3. Сравнение содержания общего IgE (нг/мл) в контрольной группе, группе с вывешиванием, группе с АДП в условиях нормальной нагрузки и группе с АДП в условиях антиортостатического вывешивания (7 мышей в группе).

Таким образом, в модели АДП в условиях антиортостатического вывешивания отмечается повышенный уровень общего IgE. При этом, несмотря на то, что при индукции АДП в условиях вывешивания, эозинофилия менее выражена, чем при индукции АДП в условиях нормальной нагрузки, уровень общего IgE в данных группах мышей сопоставим.

Анализ цитокин-опосредованного ответа в дыхательных путях в условиях гравитационной разгрузки

Локальный цитокин-опосредованный ответ

При изучении локального гуморального ответа при индукции АДП в условиях антиортостатического вывешивания проводили анализ цитокинов: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, INF γ в БАЛ мышей. Уровни IL-10, IL-13 и INF γ как у контрольных мышей, так и у мышей подвергавшихся вывешиванию, а также у мышей с АДП были ниже порога чувствительности используемого набора (данные не приведены). Вывешивание не влияло на концентрацию провоспалительных цитокинов IL-4, IL-5, IL-6 (Рис. 4). При индукции АДП в условиях опорной разгрузки отмечалось достоверное увеличение концентрации IL-4 в БАЛ мышей по сравнению с контрольной группой. Повышенная продукция локального IL-4 коррелирует с обнаруженным нами ранее повышенным системным уровнем IgE в модели АДП в условиях антиортостатического вывешивания.

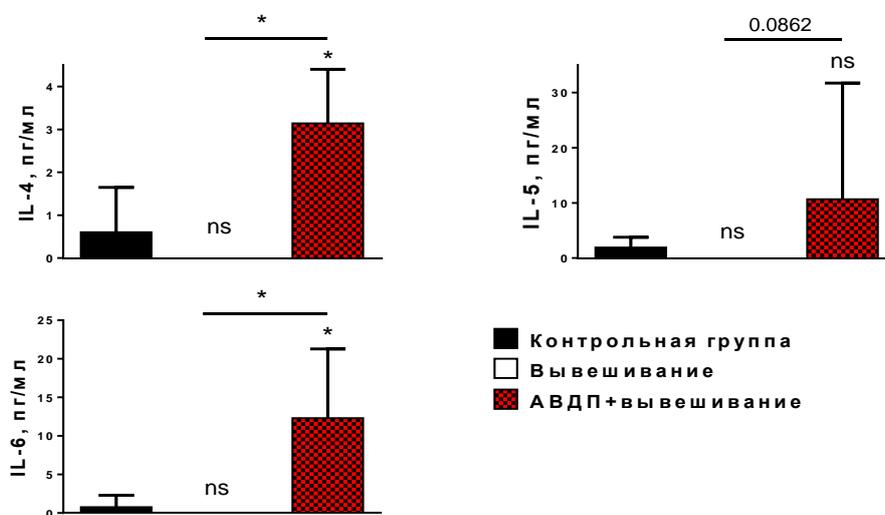


Рисунок 4. Влияние индукции АДП на концентрацию IL-4, -5, -6 (пг/мл) в условиях антиортостатического вывешивания в БАЛ мышей (7 мышей в группе).

Отмечалась тенденция к увеличению концентрации IL-5 в БАЛ мышей с индуцированным АДП в условиях опорной разгрузки, принимающего участие в хемотаксисе эозинофилов, однако отличия от контрольной группы были не достоверны. Выявлено достоверное повышение концентрации IL-6 при моделировании АДП в условиях опорной разгрузки. Таким образом, локальный гуморальный ответ при моделировании АДП в условиях опорной разгрузки носит про-аллергический и провоспалительный характер.

Системный цитокин-опосредованный ответ

При изучении системного гуморального ответа при индукции АДП в условиях вывешивания также проводили изучение изменения концентрации цитокинов IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN γ в сыворотке крови мышей. Анализ секреции цитокинов не выявил детектируемого уровня IL-10, уровни секреции IL-4, IL-6 и IL-13 у мышей с АДП не отличались достоверно по сравнению с контрольной группой и с группой мышей в условиях вывешивания без индукции АДП (данные не приведены).

Само по себе пребывание в условиях антиортостатического вывешивания не влияло на концентрацию IL-5 и IFN γ в сыворотке крови мышей (Рис. 5 А). Однако при индукции АДП в условиях вывешивания отмечалось достоверное повышение концентрации IL-5, что коррелировало с ранее выявляемой эозинофилией дыхательных путей. Концентрация IFN γ в сыворотке крови мышей с АДП в условиях вывешивания уменьшалась по сравнению с контрольной группой и с группой мышей в условиях опорной разгрузки (Рис. 5 Б). Поскольку IFN γ является Th1-ассоциированным цитокином, то при индукции АДП уменьшение его концентрации подтверждает смещение гуморального ответа в сторону Th2-ассоциированных цитокинов, что характерно для провоспалительной аллергической реакции.

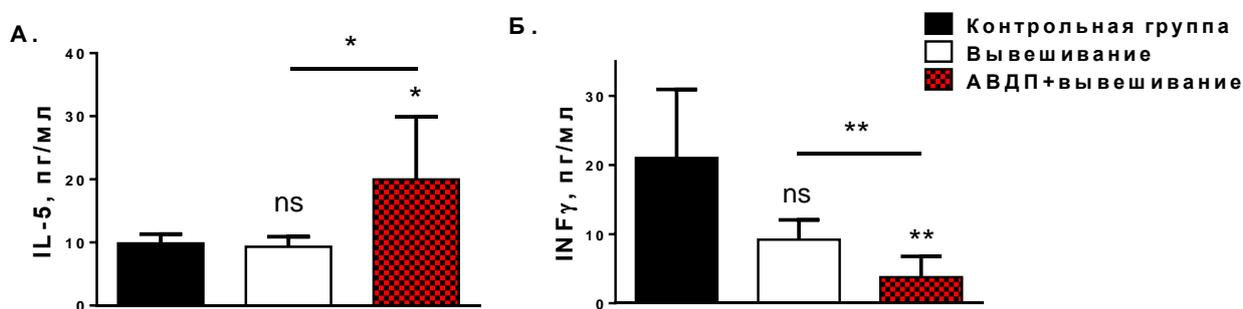


Рисунок 5. Влияние индукции АДП на концентрацию IL-5 (А) и IFN γ (Б), пг/мл, в условиях антиортостатического вывешивания в сыворотке крови мышей (7 мышей в группе).

Таким образом, системный цитокин-опосредованный иммунный ответ при индукции АДП в условиях гравитационной разгрузки носит провоспалительный Th2-опосредованный характер.

Динамика секреции БТШ70 и АТФ в процессе развития АДП в условиях нормальной опорной нагрузки

Для того чтобы оценить вовлеченность БТШ70 в процесс воспаления при аллергической бронхиальной астме использовали краткосрочную модель АДП. Концентрацию внеклеточного БТШ70 в БАЛ определяли на 24, 48 и 72 часа после последнего интрафарингеального введения аллергена.

Увеличение секреции БТШ70 во внеклеточное пространство наблюдали через 24 часа после последнего введения аллергена. Повышенный уровень БТШ70 в лаважной жидкости сохранялся и через 48 часов. Снижение концентрации внеклеточного БТШ70 наблюдалось лишь через 72 часа после последней ингаляции аллергена, уровень внеклеточного БТШ70 в

этой временной точке недостоверно превышал уровень БТШ70, определяемый в лаважных смывах преиммунных мышей (Рис. 6 А).

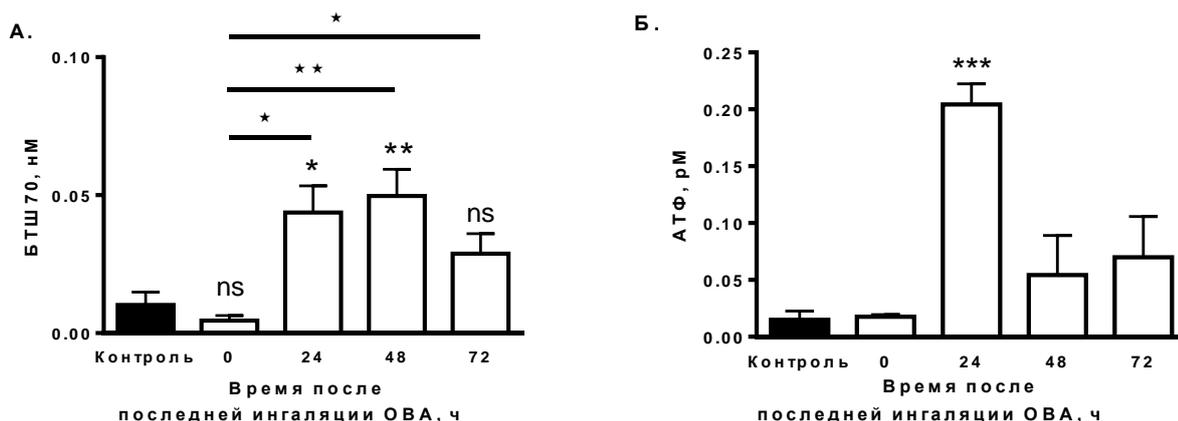


Рисунок 6. Динамика продукции внеклеточного БТШ70 (А) и АТФ (Б) в БАЛ при развитии АДП (5 мышей в группе). Значения, достоверно отличающиеся от значений, полученных для контрольной группы мышей, обозначены *, значения, достоверно отличающиеся от значений, полученных для мышей непосредственно перед последним введением аллергена (время 0 ч) обозначено *.

Нами были прослежены изменения уровня внеклеточного АТФ в БАЛ через 24, 48 и 72 часа после последней ингаляции аллергена при использовании краткосрочной модели АДП. Пик секреции АТФ приходился на 24 часа, то есть на острую фазу АДП. В эффекторной фазе и позже (через 72 часа) наблюдалось снижение уровня внеклеточного АТФ (Рис. 6 Б). Таким образом, было показано, что АТФ является маркером острой фазы АДП.

Динамика изменения концентраций внеклеточных форм АТФ и БТШ70 при индуцированном АДП

В используемой в данном исследовании краткосрочной модели АДП в отсутствие новых ингаляций аллергена наступает разрешение воспаления. Сопоставляя значения концентраций внеклеточных АТФ и БТШ70, мы показали, что, несмотря на повышение уровня внеклеточного БТШ70 в дыхательных путях, в острой фазе воспаления соотношение концентрации БТШ70:АТФ было значительно ниже, чем на стадии разрешения воспаления и чем у контрольной группы мышей (Табл. 2).

Таблица 2. Динамика соотношения концентраций внеклеточных БТШ70 к АТФ.

	Время после ингаляции аллергена, ч				Контрольная группа
	0	24	48	72	
БТШ70:АТФ	0,280±0,129	0,281±0,0471	2,281±0,280**	1,466±0,342*	1,151±0,001**

Примечание: в таблице приведены соотношения концентраций; значения, достоверно отличающиеся от значений, полученных до ингаляции (время 0 ч), отмечены * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

Таким образом, относительный недостаток внеклеточного БТШ70 был охарактеризован как одна из причин развития воспаления.

Исследование иммуногенности и аллергических свойств экзогенно вводимого БТШ70 Индукция гуморального иммунного ответа на экзогенно вводимый БТШ70

С целью проверить, не вызывает ли экзогенно вводимый БТШ70 побочных реакций, связанных с активацией иммунной системы, мышам проводили ежедневные инъекции БТШ70 в течение 7 недель с последующей оценкой уровня продукции общего БТШ70-

специфического IgG. В качестве положительного контроля мышам вводили релевантный белок БСА, обладающий сходной с БТШ70 молекулярной массой 70 кДа.

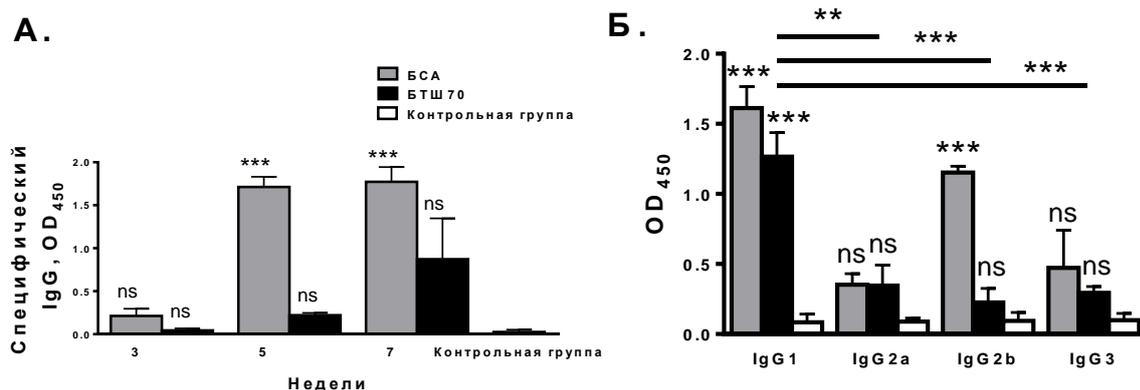


Рисунок 7. Системная секреция иммуноглобулинов в ответ на введение БТШ70. Уровень общего специфического IgG (А) и подклассов IgG (Б) в периферической крови мышей, получавших курс ежедневных внутрибрюшинных иммунизаций БСА или БТШ70 в течение 3, 5 и 7 недель. Разведение сывороток для общего IgG составляло 1:2000, для определения IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 составляло 1:200 (7 мышей в группе).

Было показано, что в отличие от БСА, БТШ70 не способен вызвать продукцию специфических IgG даже при длительной иммунизации (Рис. 7 А). Незначительное увеличение концентрации анти-БТШ70 антител было обусловлено синтезом антител субкласса IgG1 (Рис. 7 Б).

Таким образом, было показано, что при длительной иммунизации БТШ70 способен вызвать незначительное увеличение продукции IgG, выраженное преимущественно IgG1, характерным для Th2-опосредованного ответа, вызываемого экзогенным белковым антигеном (Stavnezer J., 1996). Поэтому на следующем этапе было проведено исследование аллергенности БТШ70.

Аутологичный БТШ70 не обладает аллергенными свойствами

Используя краткосрочную модель индукции АДП с применением в качестве аллергена БТШ70, мы показали, что в отличие от мышей, иммунизированных ОВА, мыши, иммунизированные БТШ70, не проявляли признаков воспаления, а именно общее количество клеток в БАЛ было не увеличено, эозинофилия дыхательных путей отсутствовала (Рис. 8).

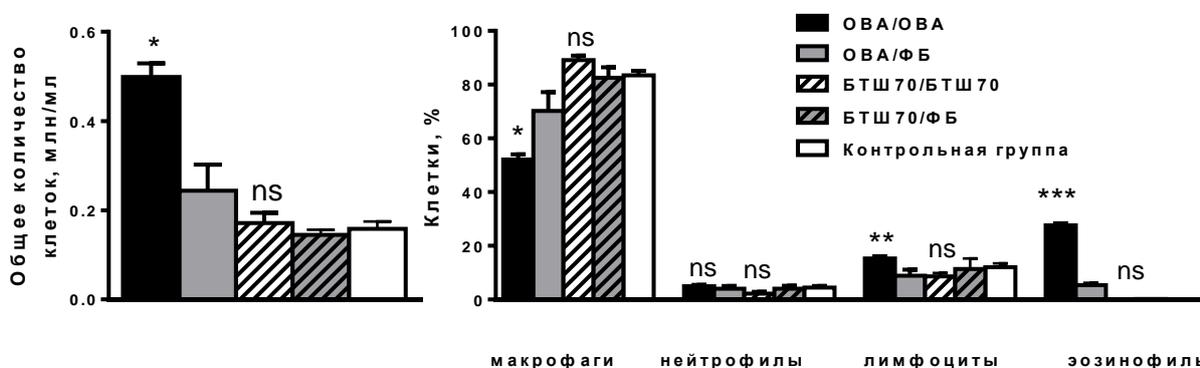


Рисунок 8. Влияние сенсibilизации и последующей ингаляции БТШ70, ОВА, ФБ на общее (млн/мл) и дифференциальное количество клеток (%) в дыхательных путях мышей при индукции АДП через 48 часов после последней ингаляции соответствующим антигеном (5 мышей в группе).

Анализ секреции проаллергических цитокинов не выявил достоверного повышения уровней IL-4, IL-5 и IL-13 в БАЛ мышей при иммунизации БТШ70 по сравнению с контрольной группой мышей (Рис. 9).

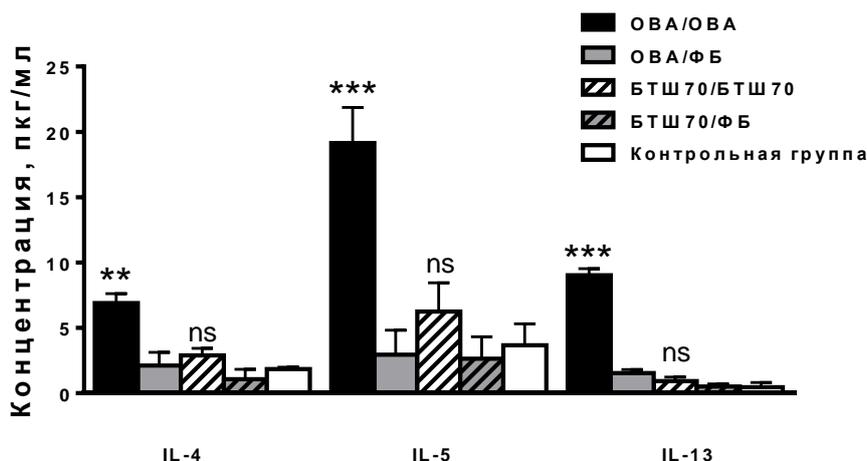


Рисунок 9. Локальное изменение уровня цитокинов в надсадочной жидкости БАЛ, характерных для аллергического типа реагирования, при введении БТШ70. Разведение лаважей 1:1 (5 мышей в группе).

Интересно отметить, что введение БТШ70 оказывало влияние на изменение локального уровня IgA. Причем повышенный уровень БТШ70-специфического IgA в БАЛ наблюдали у мышей после внутрибрюшинного введения белка и возрастал после интрафаренгиальных введений. Сходная динамика наблюдалась и в ответ на введение ОВА (Рис. 10 А).

Введение экзогенного антигена белковой природы сопровождается образованием системного специфического IgG1, что и наблюдали у мышей, получавших инъекции и ингаляции ОВА (Рис. 10 Б). Причем для повышения уровня антиген-специфического IgG1 в сыворотке периферической крови было достаточно двух внутрибрюшинных инъекций ОВА. В тоже время введение БТШ70, в соответствии со схемой индукции АДП не приводило к повышению уровня специфического IgG1 по сравнению с преиммунными мышами (Рис. 10 В).

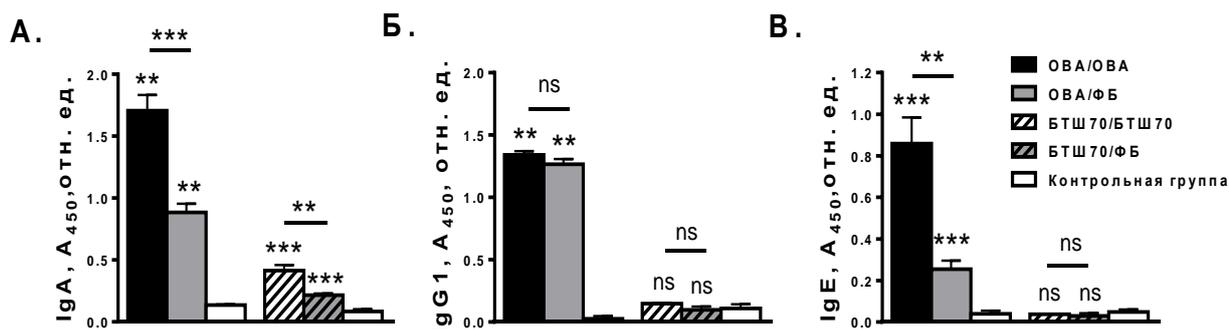


Рисунок 10. Локальное изменение IgA в БАЛ (А), IgG1 (Б) и IgE (В) в сыворотке периферической крови мышей. Разведение лаважей 1:1, разведение сывороток для определения IgG1 1:1000, IgE 1:10. Анализ образцов, взятых у мышей, получавших овальбумин или БТШ70, проводили на планшетах с иммобилизованными овальбумином и БТШ70 соответственно, образцы контрольной группы использовали и в том, и в другом случае (5 мышей в группе).

Повышение ОВА-специфического IgE наблюдалось у мышей с ОВА-индуцированным АДП, при этом ингаляции аллергена вызвали рост специфического IgE. В случае БТШ70 IgE-опосредованный ответ не был сформирован ни после внутрибрюшинного введения антигена, ни после последующего интрафарингеального введения (Рис. 10 В). Таким

образом, показали, что экзогенно вводимый аутологичный белок БТШ70 не способен вызвать АДП.

Влияние БТШ70 на развитие иммунного ответа в мышинной модели АДП в условиях антиортостатического вывешивания

Влияние БТШ70 на локальный клеточный иммунный ответ

Было проведено исследование, направленное на изучение способности внеклеточной формы БТШ70 оказывать модулирующее влияние на процесс АДП в условиях моделируемой гравитационной разгрузки на весь период эксперимента. Орорфарингеальное введение БТШ70 мышам с АДП приводило к достоверному уменьшению количества провоспалительных клеток в БАЛ по сравнению с группой мышей с АДП, не получавших БТШ70, и не отличалось от контрольной группы мышей. При введении денатурированного БТШ70 данный эффект отсутствовал (Рис. 11 А).

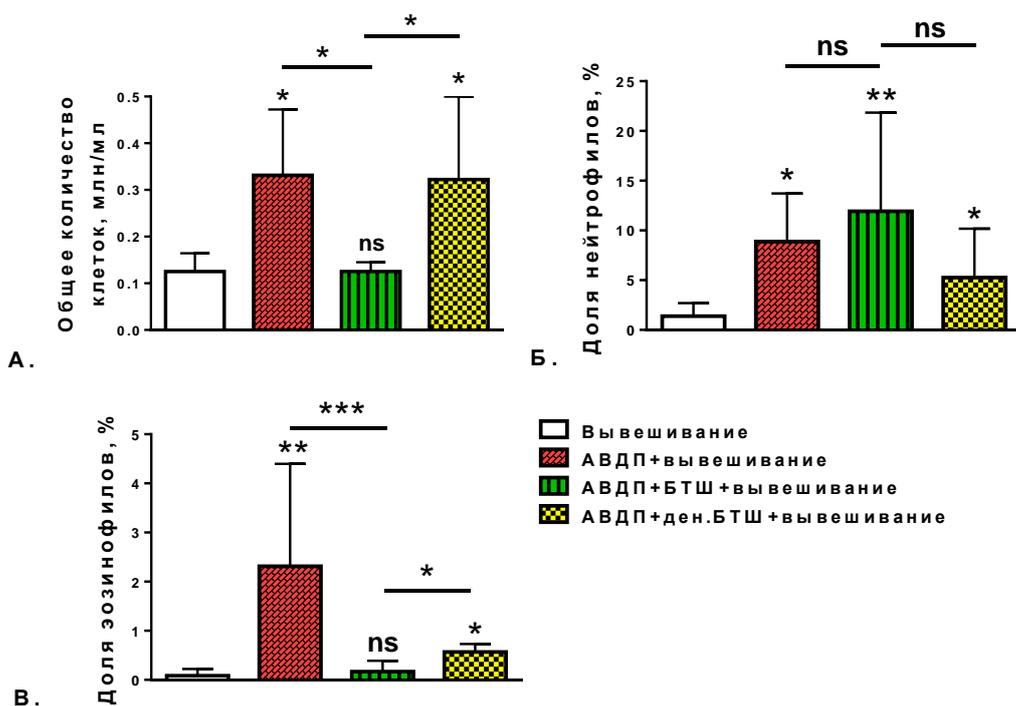


Рисунок 11. Влияние ингаляции БТШ70 в острой фазе АДП на развитие воспалительного процесса в условиях антиортостатического вывешивания. (А) Общее количество клеток, (Б) доля нейтрофилов, (В) доля эозинофилов в БАЛ мышей. Приведены результаты измерений через 48ч после введения аллергена (через 24ч после введения БТШ70). Звезды над столбцами – сравнение с группой мышей с вывешиванием, сравнение исследуемых групп отмечено крышками (7 мышей в группе).

При этом в группе мышей, получавших БТШ70, количество нейтрофилов в БАЛ через 48 часов после последней ингаляции аллергена было выше, чем в группе с АДП, не получавших БТШ70 (Рис. 11 Б), однако изменения были не достоверны. Кроме того, у мышей, получавших ингаляцию БТШ70, количество эозинофилов, основных маркеров АДП, в легких было достоверно ниже по сравнению с мышами с АДП в условиях вывешивания или мышами, получавшими вместо БТШ70 ингаляцию денатурированного БТШ70 и достоверно не отличалось от количества эозинофилов у мышей контрольной группы (Рис. 11 В).

Таким образом, введение БТШ70 в острой фазе АДП в условиях моделируемой опорной разгрузки ограничивает приток клеток в дыхательные пути за счет снижения эозинофилии, а следовательно, оказывает противовоспалительный эффект.

Влияние БТШ70 на иммуноглобулин-опосредованный про-аллергический гуморальный ответ

Была проведена оценка эффекта БТШ70 на системный и локальный иммуноглобулин-опосредованный иммунный ответ. Было показано, что вывешивание не влияло на содержание аллерген-специфических иммуноглобулинов (Рис. 12). Введение ОВА сопровождалось образованием системного ОВА-специфического IgG (Рис. 12 А). В тоже время введение БТШ70 приводило к снижению уровня специфического IgG, при сравнении с контрольной группой отличия были недостоверны. При введении денатурированного БТШ70 эффект отсутствовал (Рис. 12 А).

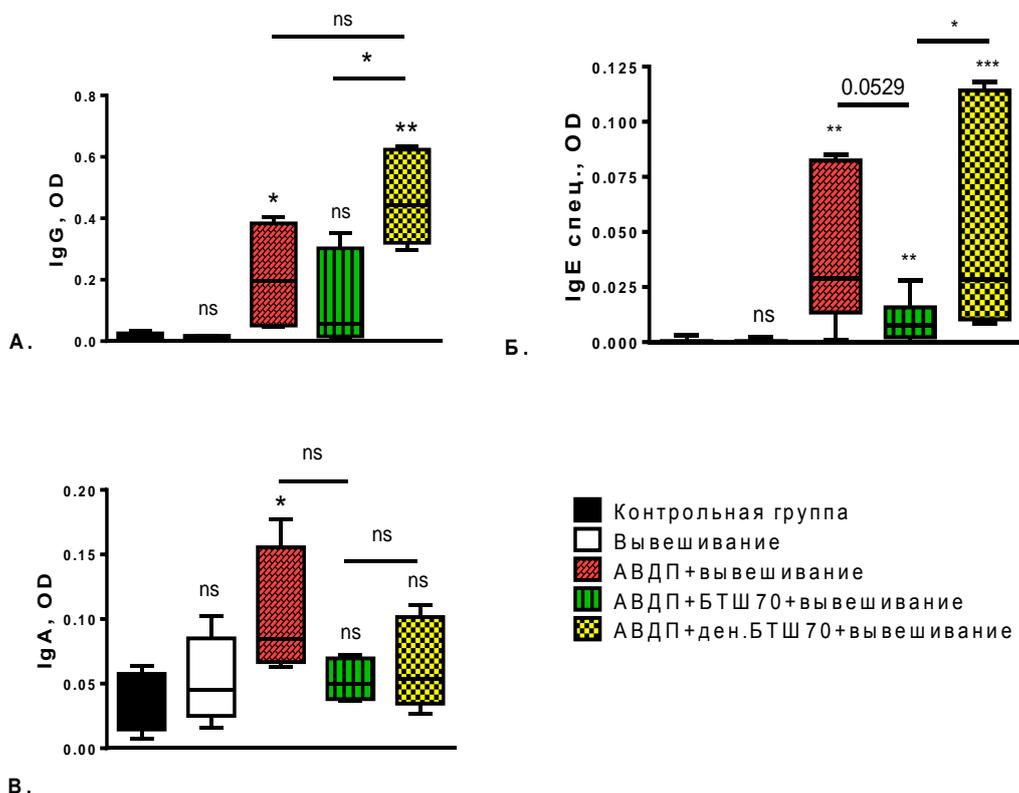


Рис. 12. Изменение гуморальных факторов, характерных для аллергического типа реагирования, при введении БТШ70/денатурированного БТШ70. Уровень ОВА-специфического IgG (А) и ОВА-специфического IgE (Б) в сыворотке периферической крови, а также уровни ОВА-специфического IgA в надосадочной жидкости БАЛ (В). Разведение лаважей 1:1, разведение сывороток для определения IgG1 1:1000, для определения IgE 1:10 (7 мышей в группе).

Одним из основных параметров, характеризующих АВДП, является повышенный уровень IgE в сыворотке периферической крови. Как было показано выше (Рис 3), индукция АВДП у мышей под воздействием опорной разгрузки, как и в условиях нормальной нагрузки, вызвала повышение уровня общего IgE. Применение БТШ70 в острой фазе воспаления, как и ожидалось, не оказывало воздействия на системный уровень общего IgE (данные не приведены). Большой интерес представляло проследить изменение аллерген-специфического IgE под действием БТШ70. При вывешивании у мышей с АВДП наблюдалось достоверное повышение ОВА-специфического IgE по сравнению с контрольной группой. При введении БТШ70 в острой фазе воспаления отмечалась тенденция к снижению выраженности IgE-опосредованного ответа по сравнению с группой с АВДП. При введении денатурированного БТШ70 эффект отсутствовал (Рис. 12 Б).

Как было показано выше (Рис. 10), при индукции АВДП в условиях нормальной опорной нагрузки, отмечалось повышение уровня ОВА-специфического IgA. Повышенный уровень IgA в БАЛ можно рассматривать как характеристику воспалительного процесса в дыхательных путях. В условиях вывешивания при индукции АВДП также наблюдали

повышение уровня IgA в БАЛ, при этом введение БТШ70 в острой фазе АДП приводило к снижению локального уровня IgA, однако изменения были не достоверны (Рис. 12 А).

Таким образом, мы показали, что экзогенно вводимый БТШ70 приводит к уменьшению выраженности про-аллергенного иммуноглобулин-опосредованного иммунного ответа.

Влияние БТШ70 на устойчивость нейтрофилов к апоптозу и процессы гибели в популяции нейтрофилов при АДП в условиях нормальной опорной нагрузки.

Как было показано ранее (Шевченко М.А., Троянова Н.И. и др., 2016), ингаляция БТШ70 мышам в острой фазе АДП способствовала тому, что уровень нейтрофилов в БАЛ сохранялся повышенным. Анализ изменения процентного содержания этих клеток в костном мозге в острой фазе развивающегося АДП и через 48 часов после последней ингаляции аллергена и показали, что процент нейтрофилов в клетках костного мозга был снижен у мышей с АДП как через 24, так и через 48 часов после последней ингаляции аллергена по сравнению с мышами, иммунизированными ОВА интраперитонеально, но не получавшими ингаляций аллергена (Табл. 3). При этом локальное введение БТШ70 в острой фазе не изменяло долю нейтрофилов в костном мозге по сравнению с группой с АДП (Табл. 3). Следовательно, БТШ70 не обладал регулирующим действием на процесс миграции нейтрофилов из костного мозга.

Таблица 3. Доля нейтрофилов среди клеток костного мозга мышей в различных стадиях АДП: в острую (через 24 ч после последней ингаляции аллергена) и в эффекторную фазу (через 48 ч после последней ингаляции аллергена).

	24 часа	48 часов
ОВА/ФБ	84,6 ± 8,1 (***)	80,4 ± 2,1 (***)
АДП	57,3 ± 9,9 (ns)	55,9 ± 10,3 (ns)
АДП + БТШ70		52,4 ± 4,7
Контрольная группа	67,1 ± 6,0 (*)	

Примечание: данные показаны для следующих групп мышей:

- группа ОВА/ФБ – сенсibilизированные мыши, получавшие орофарингеально ФБ вместо аллергена;
- группа АДП – сенсibilизированные мыши, получавшие орофарингеально ОВА;
- группа АДП+БТШ70 – мыши с ОВА-индуцированным АДП, получавшие ингаляцию БТШ70 через 24 ч после последнего введения аллергена;
- контрольная группа мышей.

Таким образом, повышенный уровень нейтрофилов в БАЛ мышей после введения БТШ70, в том числе в случае АДП в условиях вывешивания (Рис. 11), по-видимому, не связан с притоком новых нейтрофилов. Это свидетельствует в пользу предположения о том, что внеклеточный пул БТШ70 способен поддерживать выживаемость нейтрофилов, мигрировавших в дыхательные пути ранее.

С целью проверки этого предположения мы провели в первичной культуре нейтрофилов костного мозга мыши оценку протективного эффекта БТШ70 и с использованием модели РМА-индуцированной гиперактивации нейтрофилов и флуоресцентного нуклеотид-связывающего красителя SYTOX-Green показали способность БТШ70 достоверно снижать уровень внеклеточных нуклеотидов (Рис. 13), т.е. препятствовать процессам некроза и нетоза. Необходимо отметить, что денатурированный БТШ70 утрачивал вышеописанную способность.

Полученные данные позволяют предположить, что повышенный уровень нейтрофилов, наблюдаемый в БАЛ мышей, получавших БТШ70, частично обусловлен тем, что нейтрофилы не погибали по механизму нетоза или некроза. При этом следует отметить, что регистрируемые при анализе цитоспинов нейтрофилы БАЛ сохраняли нормальную морфологию.

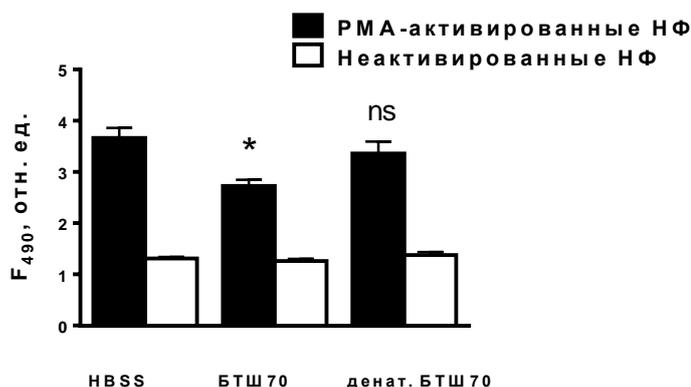


Рисунок 13. Влияние БТШ70 и денатурированного БТШ70 (денат. БТШ70) на уровень внеклеточных нуклеотидов в культуре PMA-активированных и неактивированных нейтрофилов костного мозга мыши после 4-часовой инкубации. Статистические различия показаны при сравнении с клетками, инкубированными с HBSS

Была проведена оценка влияния БТШ70 на процент нейтрофилов, связывающих Annexin V, то есть находящихся в процессе программируемой гибели. Использовали концентрации БТШ70 1 мкМ и 10 мкМ, в качестве контролей использовали стауроспорин и денатурированный БТШ70. Полученные результаты показали способность экзогенного БТШ70 дозозависимо усиливать спонтанный апоптоз в культуре нейтрофилов. Денатурированный БТШ70 не обладал подобной активностью (Рис. 14).

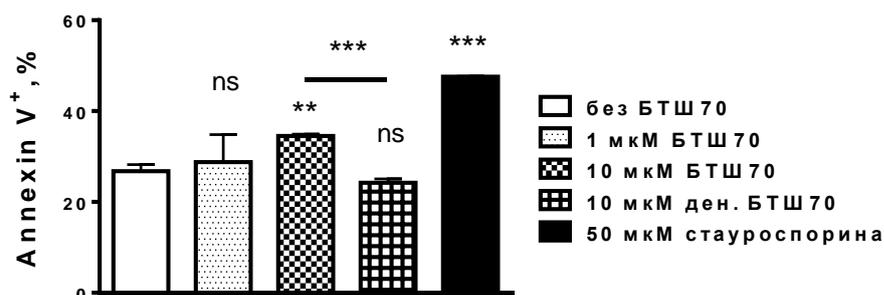


Рисунок 14. Оценка влияния БТШ70 на миграцию и тип клеточной гибели нейтрофилов костного мозга. Процент клеток в регионе AnnexinV⁺ сравнивали в образцах нейтрофилов, инкубированных без добавления БТШ70, в присутствии 1 мкМ БТШ70 или 10 мкМ БТШ70, а также в образцах с 10 мкМ денатурированного БТШ70, и в образцах с 50 мкМ стауроспорина.

Таким образом, внеклеточный БТШ70 оказывает противоаллергическое действие, увеличивая выживаемость нейтрофилов в очаге воспаления за счет подавления процессов некроза и некроза, стимулирует их гибель по программе апоптоза, что в свою очередь, приводит к разрешению-воспалительного процесса.

Влияние БТШ70 на АТФ-индуцированный хемотаксис ДК

Чтобы подтвердить гипотезу о том, что одним из механизмов протективного действия БТШ70 при АДП является прямое взаимодействие с внеклеточным АТФ, мы исследовали влияние БТШ70 на хемотаксическую активность АТФ в условиях нормальной опорной нагрузки. Поскольку основными клетками, чувствительными к изменению концентрации АТФ во внеклеточном пространстве, как было показано группой Idzko (Idzko M., Hammad H. et al., 2007), являются ДК, мы провели оценку изменения миграционной активности ДК в ответ на АТФ в присутствии БТШ70. Миграцию выращенных из костного мозга ДК оценивали в ответ на АТФ, АДФ, БТШ70 и смесь БТШ70 с АТФ в соотношении 1:1.

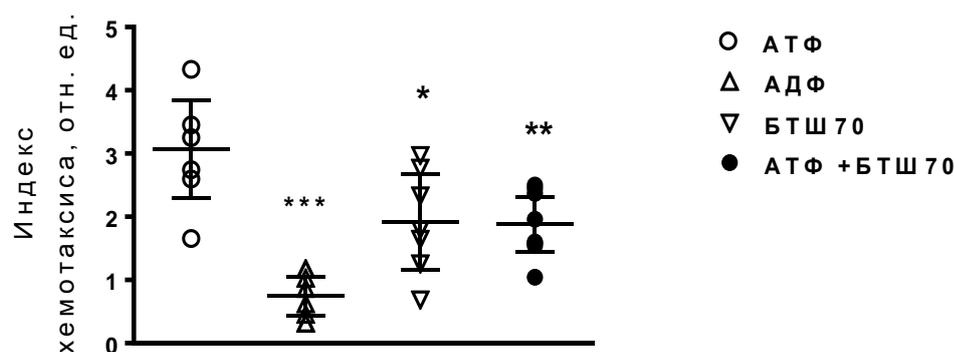


Рисунок 15. Влияние БТШ70 на АТФ-индуцированный хемотаксис ДК. Миграция ДК, выращенных из костномозговых предшественников в ответ на следующие стимулы: АТФ, АДФ, БТШ70 и АТФ в присутствии БТШ70 в соотношении 1:1 (M±SE). Все аттрактанты взяты в концентрации 1×10^{-6} М. Для каждого из хемоаттрактантов было проведено 3 независимых эксперимента.

Показали, что наиболее выраженным хемотаксическим эффектом при равных концентрациях обладал АТФ. БТШ70 также обладал способностью вызывать миграцию ДК, однако индекс хемотаксической активности был значительно ниже, чем в случае АТФ. Хемотаксическая активность АДФ была значительно ниже активности БТШ70. При добавлении БТШ70 в соотношении 1:1, способность АТФ вызывать миграцию ДК снижалась вдвое и индекс хемотаксиса становился сопоставимым с индексом в случае использования одного БТШ70 (Рис. 15).

Таким образом, при одинаковых концентрациях хемотаксическая активность возрастала в ряду АДФ < БТШ < АТФ; в присутствии БТШ70 способность АТФ вызывать миграцию ДК достоверно снижалась.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе была разработана модель АВДП, совмещенного с моделью антиортогостатического вывешивания. При подборе модели учитывалось, что АВДП – комплексное заболевание, для которого характерна пролиферация Th2 в ответ на вдыхаемые аэроаллергены (Afshar R., Medoff B.D. et al., 2008). Как следствие, АВДП ассоциируют с увеличением продукции Th2 цитокинов – IL-4, 5, 13 и повышенным уровнем аллерген-специфических IgG1 и IgE. Кроме того, для АВДП характерно воспаление, гиперчувствительность, возникающие, в том числе, вследствие массового притока лейкоцитов в дыхательные пути (Lemanske R.F., Jr. Busse W.W., 2003). Исследования кинетики изменений характерных для АВДП показателей выявили его двухфазное развитие, как у сенсibilизированных пациентов, так и в мышинных моделях (Lommatzsch M., Julius P. et al., 2006). Ранее исследование развития АВДП в модельных экспериментах применительно к космическим полетам было выполнено группой Jang T.Y. et al. (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015). Авторы проводили вывешивание только на период индукции локального иммунного ответа, в то время как индукция системного ответа была выполнена в условиях нормальной опорной нагрузки. В настоящей работе с целью оценить влияние опорной разгрузки на развитие как системного, так и локального иммунного ответа, вывешивание проводили на весь период эксперимента. В связи с этим необходимо было подобрать оптимальную длительность модели и сенсibilизирующий агент. В данной работе за основу была выбрана модель, описанная Idzko и соавт. (Idzko M., Hammad H. et al., 2007). Проведенное в данной работе сравнение краткосрочной и длительной модели АВДП подтвердило, что при сокращении времени между экспозициями аллергена сохраняются все основные вышеприведенные характеристики. Это позволило нам использовать краткосрочную модель для совмещения с моделью антиортогостатического вывешивания.

В настоящей работе показали, что при индукции АДП в условиях моделируемой опорной разгрузки происходит ослабление клеточного ответа, но интенсификация гуморального ответа, что может являться мишенью для терапевтического воздействия БТШ70. Анализ цитокин-опосредованного ответа подтвердил проаллергический характер воспаления. Таким образом, при длительном антиортостатическом вывешивании усугубляется тяжесть клинического течения аллергического заболевания. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости более глубокого изучения проблемы сенсibilизации организма к аллергенам различной природы, а также разработки новых подходов для профилактики и лечения аллергических заболеваний у человека, живущего и работающего в условиях КП.

Препарат, применяемый для профилактики сенсibilизации перед КП, равно как и для купирования аллергических проявлений, возникающих в условиях длительного КП, должен обладать следующими характеристиками: не вызывать супрессии истощённой во время полёта иммунной системы; быть наиболее близким к естественным белкам организма, чтобы не вызывать гиперактивации иммунной системы; не вызывать аутоиммунные реакции при длительном использовании.

В данной работе относительный недостаток внеклеточного БТШ70 был охарактеризован как одна из причин развития воспаления. Ранее был показан противовоспалительный эффект БТШ70 при моделировании АДП в условиях нормальной нагрузки (Шевченко М.А., Троянова Н.И. и др., 2016). При моделировании эффектов микрогравитации посредством антиортостатического вывешивания также отмечалось противовоспалительное воздействие БТШ70, которое проявлялось в виде стабилизации клеточного иммунного ответа за счет снижения притока провоспалительных клеток в легкие, снижения выраженности иммуноглобулин-опосредованного иммунного ответа. Таким образом, супрессивный эффект, показанный ранее для БТШ70 при АДП в нормальных условиях, сохранялся и в условиях моделируемой опорной разгрузки.

Протективное действие БТШ70 очевидно является комплексным и механизмы его до конца не изучены. В данной работе было проведено исследование протективных свойств этого протеина, связанных с АТФ-азной активностью БТШ70.

Известно, что АТФ обладает ярко выраженной провоспалительной активностью. Массовый выход АТФ в межклеточное пространство также был показан ранее группой Idzko (Idzko M., Hammad N. et al., 2007). Кинетика этого показателя, прослеженная в данной работе, подтвердила предположение о том, что увеличение уровня внеклеточного АТФ характерно только для острой фазы воспаления. Сопоставляя полученные нами данные об изменении уровня нейтрофилов в БАЛ при индукции АДП и уровня внеклеточного АТФ в лаважной жидкости, можно сделать предположение о связи между массовой гибелью нейтрофилов и выбросом АТФ во внеклеточное пространство дыхательных путей, являющегося триггером воспаления. Связывание АТФ с P2X или P2Y рецепторами ДК дыхательных путей приводит к поляризации Т-клеточного ответа в сторону Th2, притоку и активации эозинофилов и гиперчувствительности дыхательных путей. Гидролиз АТФ или блокирование P2 рецепторов антагонистами предотвращает повышение экспрессии провоспалительных цитокинов, эозинофилию дыхательных путей, снижение вдыхаемого объема при измерении функции легких (Idzko M., Hammad N. et al., 2007). Наличие АТФ-азного домена у белков семейства БТШ70 позволяет сделать предположение о вовлечении этих белков в процесс регулирования внеклеточного уровня АТФ. Как было показано в нашей работе, секреция БТШ70 в межклеточное пространство также повышалась через 24 часа после ингаляции аллергена, однако повышенный уровень внеклеточного БТШ70 был характерен и для эффекторной фазы воспаления, а также на этапе разрешения воспаления.

Müller et al. (Muller T., Grimm M. et al., 2010) показали, что АТФ *in vitro* усиливает хемотаксис эозинофилов и ДК. С использованием ДК, выращенных из костного мозга мыши, нами было показано что в концентрации 1×10^{-6} хемотаксическая активность АТФ значительно превышала активность АДФ и БТШ70. В данной работе нами было обнаружено, что сам БТШ70 проявлял низкую хемотаксическую активность, однако в соотношении

АТФ:БТШ70 1:1, БТШ70 был способен блокировать АТФ-направленную миграцию ДК, причем индекс хемотаксиса снижался до уровня, наблюдаемого при миграции в ответ на БТШ70. Таким образом, было косвенно подтверждено предположение о том, что БТШ70 предотвращает развитие воспаления путем дефосфорилирования АТФ до АДФ, что подтверждает гипотезу о протективном действии БТШ70 посредством связывания АТФ.

Помимо АТФ-азной активности БТШ70 обладает шаперонной активностью – способен предотвращать денатурацию белков, что также может обуславливать его противовоспалительную активность. Поскольку нейтрофилы острой фазы могут являться основным источником внеклеточной АТФ, нами было исследовано воздействие БТШ70 на нейтрофилы и показано, что противоаллергическое действие БТШ70 в модели АВДП проявляется в подавлении гиперактивации нейтрофилов, приводящей к их гибели и усилению воспаления. Кроме того, БТШ70 способствует гибели нейтрофилов по программе апоптоза, и применительно к локальному воспалительному ответу при АВДП такое воздействие способствует разрешению воспаления. Опираясь на информацию о шаперонных свойствах белков теплового шока (Young J.C., 2010), можно предположить, что, связывая внеклеточный АТФ, БТШ70 одновременно препятствует деградации белков и гибели нейтрофилов, сопровождающейся в свою очередь новым выбросом АТФ.

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что БТШ70 может подавлять воспалительный процесс в дыхательных путях в условиях моделируемой опорной разгрузки, не вызывает побочных эффектов при локальном введении и обладает противовоспалительными свойствами. Механизм этого противовоспалительного воздействия базируется на АТФ-азной активности БТШ70 и его шаперонных свойствах.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная модель аллергического воспаления дыхательных путей, совмещенного с моделью антиортостатического вывешивания, позволяет охарактеризовать особенности проявления аллергического воспаления дыхательных путей в условиях опорной разгрузки
2. Охарактеризован клеточный ответ при АВДП в условиях опорной разгрузки: наблюдается менее выраженный приток лейкоцитов в легкие, снижена доля эозинофилов и увеличен приток нейтрофилов по сравнению с АВДП в условиях нормальной нагрузки.
3. Системный гуморальный ответ при АВДП в условиях антиортостатического вывешивания характеризуется повышенным уровнем секреции общего IgE, аллерген-специфических IgG и IgE, а также IL-5, IFN γ в периферической крови. Локальный гуморальный ответ характеризуется повышением уровня аллерген-специфического IgA, а также повышением концентрации IL-4, IL-5, IL-6 в БАЛ мышей.
4. При длительном введении аутологичный БТШ70 не обладает иммуногенностью: не вызывает образования специфических IgG. БТШ70 не способен индуцировать аллергическое воспаление дыхательных путей.
5. Увеличение концентрации внеклеточного БТШ70 в острой фазе воспаления в условиях антиортостатического вывешивания препятствует повышению концентрации специфического IgE в сыворотке крови и ограничивает выход эозинофилов в дыхательные пути.
6. БТШ70 обладает способностью поддерживать выживаемость мигрировавших в дыхательные пути нейтрофилов, препятствуя процессам некроза и нетоза, и способствует усилению спонтанного апоптоза. БТШ70 способен подавлять АТФ-индуцированный хемотаксис ДК за счет АТФ-азной активности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК России

1. Shevchenko M.A., Bolkhovitina E.L., **Servuli E.A.**, Sapozhnikov A.M. Elimination of *Aspergillus fumigatus* conidia from the airways of mice with allergic airway inflammation. // *Respiratory Research*. – 2013. – V.14. – N.1. – P.78-90.
2. **Сервули Е.А.**, Постовская А.М., Сапожников А.М., Шевченко М.А. Динамика изменения концентраций внеклеточных форм АТФ и белка теплового шока 70 кДа (БТШ70) при индуцированном аллергическом воспалении дыхательных путей. // *Российский Иммунологический Журнал*. – 2014. – Т.8(17). – №3. – С.398-401.
3. Троянова Н.И., Постовская А.М., **Сервули Е.А.**, Сапожников А.М., Шевченко М.А. Характеристика острой и эффекторной фазы аллергического воспаления дыхательных путей с целью подбора параметров для оценки регуляторных свойств БТШ70. // *Российский Иммунологический Журнал*. – 2015. – Т.9(18) – №2(1). – С.328-330.
4. Шевченко М.А., Троянова Н.И., **Сервули Е.А.**, Болховитина Е.Л., Федорина А.С., Сапожников А.М. Анализ иммуномодулирующих эффектов внеклеточной формы HSP70 в мышинной модели аллергического воспаления дыхательных путей. // *Биохимия*. – 2016 – Т.81. – №11. – С.1643 – 1657.
5. **Сервули Е.А.**, Федорина А.С., Троянова Н.И., Шевченко М.А. Исследование роли нейтрофилов в развитии аллергического воспаления дыхательных путей. // *Российский иммунологический журнал*. – 2016. – Т.10(19). – N.2(1). – С.118-120.
6. Shevchenko M.A., Bogorodskiy A.O., Troyanova N.I., **Servuli E.A.**, Bolkhovitina E.L., Büldt G., Fahlke C., Gordeliy V.I., Gensch T., Borshchevskiy V.I. , Sapozhnikov A.M. *Aspergillus fumigatus* infection-induced neutrophil recruitment and location in the conducting airway of immunocompetent, neutropenic, and immunosuppressed mice. // *Journal of Immunology Research*. – Volume 2018. – Article ID 5379085, 12 pages.
7. **Е.А. Сервули**, С.А. Пономарев, М.А. Шевченко, Выбор оптимальной модели овальбумин-индуцированного аллергического воспаления дыхательных путей для оценки особенностей воспалительного ответа у мышей при моделировании эффектов микрогравитации в условиях антиортостатического вывешивания. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. – 2019. – Т.53. – N.3. – С.104-107

Тезисы докладов научных конференций

1. **Servuli E.**, Shekhovtsova E., Sapozhnikov A., Shevchenko M. Systemic but not local administration of mouse Hsp70 alter the local respiratory tract immune response in *A. fumigatus* induced asthma mouse model. //The materials of the 29th EAACI Congress, London, June 2010. *Allergy*. – 2010. – V.65. – N.92. – P.558-559.
2. **Servuli E.**, Bolkhovitina E., Sapozhnikov A., Shevchenko M. Application of small dose of Hsp70 is able to prevent manifestation of allergic airway inflammation in an animal model of asthma. //The materials of the 10th EAACI GA²LEN Immunology Winter School Basic Immunology Research in Allergy, Åre, Sweden, 12 – 15 February 2012, P. 6-7
3. **Servuli E.A.**, N. Troyanova, E. Bolkhovitina, A. Sapozhnikov. Extracellular heat shock protein 70 inhibits impairment of airway neutrophils responses in induced allergic airway inflammation. // Abstracts of the European Congress of Immunology. September 5-8, 2012. Glasgow, Scotland, United Kingdom. *Immunology*. – 2012. – V.137 – N.1. – P.447
4. **Servuli, E**; Postovskaya, A; Troyanova, N; Fedorina, A; Shevchenko, M; Time-dependent bone marrow neutrophil activation during induced allergic airway inflammation. // *Allergy*, 2016, 71 (Suppl. 102), P.231
5. **Сервули Е.А.**, Пономарев С.А., Шевченко М.А. Анализ эффектов БТШ70 на развитие иммунного ответа в мышинной модели аллергического воспаления дыхательных путей с антиортостатическим вывешиванием нижних конечностей. // XLIII Королёвские академические чтения по космонавтике, 29 января — 1 февраля 2019. Сборник тезисов. Том 2. С.214-216.

Статьи в научных сборниках и периодических научных изданиях

1. Shevchenko M, Bolkhovitina E, Kalashnikova O, **Servuli E**; Sapozhnikov A. Extracellular heat shock protein 70 inhibits induced allergic airway inflammation. // *Allergy*. – 2012. – V.67. – N.96. – P. 68.
2. Shevchenko MA, Bolkhovitina EL, **Servuli EA**, Troyanova N.I., Sapozhnikov AM. The implication of extracellular HSP70 in the natural regulation of allergic airway inflammation. // *Allergy and Asthma* 2013, Bruges, Belgium, may 23-24.
3. Троянова Н.И., Болховитина Е.Л., **Сервули Е.А.**, Сапожников А.М., Шевченко М.А. Локальное введение белка БТШ70 подавляет развитие воспаления в легких мышей с овальбумин-индуцированной астмой. // *Материалы симпозиума. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Новосибирск 12-17 июля 2015г., С.458*
4. Shevchenko M.A., Troyanova N.I., Posyovskaya A.M., **Servuli E.A.**, Sapozhnikov A.M. Suppressive effects of Hsp70 on activated neutrophils in allergic airway inflammation. // *Abstracts of the 4 th European Congress of Immunology - ECI 2015 - Vienna, Austria, September 2015, P. 499.*
5. Shevchenko M., Troyanova N., **Servuli E.**, Fedorina A., Mirzoev R., Bolkhovitina E., Sapozhnikov A. The influence of immunosuppression on intraepithelial airway mucosal dendritic cell. // *European Journal of Immunology*. – 2016. – V.46 – N.1. – P.948-949.
6. Bolkhovitina E.L., Chursanova E.N., **Servuli E.A.**, Sapozhnikov A.M., Shevchenko M.A. Implication of neutrophils in allergic airway inflammation. // *Allergy*. – 2018. – V.73. – N.105. – P.515.
7. Чурсанова Е.Н., **Сервули Е.А.**, Болховитина Е.Л., Федорина А.С., Сапожников А.М., Шевченко М.А. Исследование механизма переключения классического воспаления на аллергический тип реагирования // *Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов XXX зимней молодежной научной школы. 2018. С.70.*

Список используемых сокращений:

IFN γ – интерферон гамма

IgM; IgG; IgA; IgE – иммуноглобулины классов М; G; A; E.

IL – интерлейкин

LPS – lipopolysaccharide, липополисахарид

PMA – phorbol myristate acetate, фарбол-12-миристат-13-ацетатом, активатор нейтрофилов

Th1 (2) – Т-хелперы первого (второго) типа

АВДП – аллергическое воспаление дыхательных путей

АДФ, АТФ – аденозиндифосфат, аденозинтрифосфат

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

БСА – бычий сывороточный альбумин

БТШ 70 – белок теплового шока 70 кДа

ДК – дендритные клетки

ИФА – иммуноферментный анализ

КП – космический полет

ОВА – овальбумин

ФБ – фосфатный буфер