

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ ИНСТИТУТ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ РАН

На правах рукописи

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 – аллергология и иммунология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

к.м.н., Пономарев Сергей Алексеевич

Научный консультант:

к.б.н., Шевченко Марина Александровна,

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
2. ВВЕДЕНИЕ	8
3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
3.1. ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ПИЛОТИРУЕМЫХ КП	14
3.1.1. Врожденный иммунный ответ	16
3.1.2. Адаптивный иммунный ответ	18
3.1.3. Цитокин-опосредованный гуморальный иммунный ответ	22
3.2. МОДЕЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ С АНТИОРТОСТАТИЧЕСКИМ ВЫВЕШИВАНИЕМ	23
3.3. АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ	27
3.3.1. Сенсibilизация	28
3.3.2. Субпопуляции ДК	31
3.3.3. Развитие воспаления в дыхательных путях	33
3.3.4. Врожденные лимфоидные клетки	36
3.3.5. Гистологическая картина при АВДП	37
3.3.6. Респираторная система грызунов	40
3.3.7. Модели для исследования механизмов АВДП	41
3.4. БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА 70кДа	48
3.4.1. Гомология и иммуногенность	49
3.4.2. Структурные особенности, определяющие основные функции БТШ70	49
3.4.3. Особенности внеклеточного пула БТШ70	53
3.4.4. Роль БТШ70 в АВДП	53
4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	60
4.1. ЖИВОТНЫЕ	60
4.2. ВЫДЕЛЕНИЕ БТШ70 ИЗ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК МЫШЕЙ	60
4.2.1. Получение гомогенатов внутренних органов животных	60
4.2.2. Выделение БТШ70 методом аффинной хроматографии	61
4.2.3. Очищение от избытка АТФ диализом в бикарбонатном буфере	61

4.2.4. Определение концентрации белка.....	62
4.2.5. Анализ полученного препарата БТШ70 методом электрофоретического разделения	62
4.2.6. Идентификация БТШ70 методом иммуноблотинга	63
4.2.7. Определение наличия примеси LPS.....	64
4.3. МОДЕЛЬ АВДП.....	65
4.3.1. Длительная модель овальбумин-индуцированного воспаления дыхательных путей.....	65
4.3.2. Краткосрочная модель овальбумин-индуцированного воспаления дыхательных путей.....	65
4.3.3. БТШ70-индуцированное воспаление дыхательных путей в краткосрочной модели АВДП.....	66
4.3.4. Индукция гуморального иммунного ответа на аутологичный БТШ70 при экзогенном введении	66
4.3.5. Введение БТШ70 в дыхательные пути мышей	66
4.4. АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЕ ВЫВЕШИВАНИЕ.....	67
4.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА И ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЛАВАЖА	67
4.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОКИНОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ.....	68
4.7. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ	70
4.7.1. Определение содержания иммуноглобулинов.....	70
4.7.2. Определение концентрации внеклеточного БТШ70	71
4.7.3. Определение содержания цитокинов в бронхоальвеолярных смывах	72
4.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО АТФ.....	72
4.9. ВЫДЕЛЕНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ	73
4.9.1. Выделение клеток костного мозга мыши	73
4.9.2. Выделение нейтрофилов из клеток костного мозга методом негативной селекции	73
4.9.3. Определение чистоты популяции нейтрофилов, выделенных из клеток костного мозга	74
4.9.4. Определение влияния БТШ70 на активацию культивированных нейтрофилов.....	75

4.10. ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДК ИЗ КОСТНОМОЗГОВЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ.....	76
4.11. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО ХЕМОТАКСИСА ДК	77
4.12. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ	78
4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	79
5.1. РАЗРАБОТКА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ ИНДУЦИРОВАННОГО АВДП В УСЛОВИЯХ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ	79
5.1.1. Сравнение длительной и краткосрочной модели АВДП	79
5.1.2. Сравнение краткосрочной модели с использованием ОВА различной степени очистки от липополисахарида	80
5.2. ОЦЕНКА ОСОБЕННОСТЕЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ	83
5.2.1. Сравнение параметров клеточного ответа в дыхательных путях в условиях нормальной нагрузки и гравитационной разгрузки	84
5.2.2. Сравнение системного иммуноглобулин-опосредованного про-аллергического гуморального ответа при развитии АВДП в условиях нормальной нагрузки и гравитационной разгрузки	87
5.2.3. Анализ цитокин-опосредованного ответа в дыхательных путях в условиях гравитационной разгрузки	89
5.3. ДИНАМИКА СЕКРЕЦИИ БТШ70 В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ АВДП В УСЛОВИЯХ НОРМАЛЬНОЙ ОПОРНОЙ НАГРУЗКИ	93
5.4. ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО АТФ ПРИ АВДП В УСЛОВИЯХ НОРМАЛЬНОЙ ОПОРНОЙ НАГРУЗКИ	95
5.5. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ФОРМ АТФ И БТШ70 ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ АВДП	96
5.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ И АЛЛЕРГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭКЗОГЕННО ВВОДИМОГО БТШ70, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СИНГЕННОГО ОРГАНИЗМА	97
5.6.1. Индукция гуморального иммунного ответа на экзогенно вводимый БТШ70, выделенный из сингенного организма	97
5.6.2. Аутологичный БТШ70 не способен вызвать АВДП	101
5.7. ВЛИЯНИЕ БТШ70 НА РАЗВИТИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ АВДП В УСЛОВИЯХ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ	106

5.7.1. Влияние БТШ70 на локальный клеточный иммунный ответ.....	108
5.7.2. Влияние БТШ70 на иммуноглобулин-опосредованный про- аллергический гуморальный ответ	109
5.8. ВЛИЯНИЕ БТШ70 НА УСТОЙЧИВОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ К АПОПТОЗУ И ПРОЦЕССЫ ГИБЕЛИ В ПОПУЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ АВДП В УСЛОВИЯХ НОРМАЛЬНОЙ ОПОРНОЙ НАГРУЗКИ.....	112
5.9. Влияние БТШ70 на АТФ-индуцированный хемотаксис ДК.....	119
5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	121
6. ВЫВОДЫ.....	129
7. БЛАГОДАРНОСТИ	130
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131

1. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

CD – кластеры дифференцировки

DAMP – damage-associated molecular patterns, молекулярные детерминанты, ассоциированные с повреждением

ECP – эозинофильный катионный белок

HBSS – раствор Хэнкса

HLA – human leukocyte antigen, человеческий лимфоцитарный антиген

HSE – heat shock elements, регуляторные транскрипционные элементы теплового шока

HSF – heat shock factor, факторы теплового шока

IFN γ – интерферон гамма

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

IL – интерлейкин

LPS – lipopolysaccharide, липополисахарид

MHC – major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости

NK-клетки – natural killer cells, естественный киллеры

PAR – protease activated receptor, протеаза-активируемые рецепторы

PMA – phorbol myristate acetate, фэрбол-12-миристан-13-ацетатом, активатор нейтрофилов

PRR – pathogen recognition receptor, патоген-распознающие рецепторы

SCF – stem-cell factor, фактор стволовых клеток

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

TLR – Toll-like receptors, рецепторы, подобные Toll-рецептору мушки

Drosophila fruit fly

TNF- α (β) – фактор некроза опухоли альфа (бетта)

TMB – тетраметилбензидин

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан

TSLP – thymus stromal lymphopoietin; стромальный лимфопоэтин тимуса

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

АВДП – аллергическое воспаление дыхательных путей

АДФ – аденозиндифосфат

АПК – антиген-представляющая клетка

АТФ – аденозинтрифосфат

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

БСА – бычий сывороточный альбумин

БТШ – белок теплового шока

БТШ70 – белок теплового шока 70 кДа

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДК – дендритные клетки

ИФА – иммуноферментный анализ

КП – космический полет

МКС – международная космическая станция

ОВА – овальбумин

ПААГ – полиакриламидный гель

СЛЦ – свободные легкие цепи иммуноглобулинов

Т-ФБ – фосфатный буфер с добавлением 0,05% Tween-20

ФБ – фосфатный буфер

2. ВВЕДЕНИЕ

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. Показано, что в условиях космического полета (КП) происходит перестройка иммунной системы. С одной стороны, при длительных полетах 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). В то же время, описано изменение цитокинового профиля в сторону экспрессии провоспалительных цитокинов, а также влияние КП 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. И действительно, 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 во время космических миссий, как длительных (Crucian B., Babiak-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 (МКС), 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., Babiak-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 приводят к необходимости 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 АВДП

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, занимающихся иммуномодулирующими препаратами естественной природы, 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 АВДП, 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 антиортоstaticеского 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 АВДП 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 АВДП, 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 АВДП.

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 АВДП. 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 нетоза мигрировавших в легкие нейтрофилов, и уменьшения концентрации провоспалительного медиатора – внеклеточного АТФ.

3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

3.1. Особенности функционирования иммунной системы в условиях пилотируемых КП

Иммунная система является одной из основных систем организма, принимающих участие в поддержании гомеостаза и объединяющая все системы организма. Во время КП на иммунную систему человека воздействует множество потенциально негативных факторов, среди которых к наиболее значимым, кроме эффектов различных уровней гравитации и космической радиации, относится пребывание в искусственной среде обитания и гипокинезия в условиях ограниченного замкнутого пространства (Morukov B., Rykova M. et al., 2011). Для осуществления КП необходимо решение комплекса проблем, связанных с сохранением здоровья и работоспособности экипажа на всех стадиях проведения экспедиции и после ее завершения (Григорьев А.И. Потапов А.Н., 2011, Моруков Б.В., Рыкова М.П. и др., 2013).

Давно известно, что факторы окружающей среды влияют на иммунные реакции. По данным многочисленных исследований, длительные КП вызывают нарушения иммунитета, которые являются факторами риска для безопасности космонавта и успеха полета (Yi B., Rykova M. et al., 2015, Spielmann G., Agha N.H. et al., 2019). Иммунная дисрегуляция – одно из негативных последствий для здоровья, вызванных орбитальным полетом в космос. Хотя космонавты во время полета изолированы от болезнетворных микроорганизмов, присутствующих в атмосфере Земли, сообщается об увеличении случаев инфекционных заболеваний и реакций гиперчувствительности. Нарушения иммунитета возникают не только после приземления, но и непосредственно во время полета, и часто эти изменения сохраняются в течение всего КП (Crucian B., Stowe R. et al., 2013, Mermel L.A., 2013, Crucian B., Simpson R.J. et al., 2014, Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015).

Происходящее во время космической миссии изменение субпопуляционного состава клеточных факторов адаптивного и врожденного иммунитета, а также их функциональной активности является в первую очередь приспособительной реакцией. Набор признаков этой реакции свидетельствует о том, что для перестройки

иммунной системы требуется мобилизация большого количества ее функциональных ресурсов, что достигается за счет ее выраженного напряжения. Но длительное напряжение иммунной системы может приводить к истощению её резервных возможностей, особенно у лиц, не обладающих достаточными функциональными резервами (Dhabhar F.S., 2009, Моруков Б.В., Рыкова М.П. и др., 2013).

Снижение способности иммунокомпетентных клеток отвечать на чужеродное воздействие приводит к риску развития вторичного иммунодефицита, что в свою очередь обуславливает повышенный риск возникновения различных заболеваний, среди которых бактериальные и вирусные инфекции. Помимо этого могут возникнуть аутоиммунные нарушения, при которых организм воспринимает собственные антигены как чужеродные и начинает их элиминацию. Патологически сильный иммунный ответ на внешние антигены может привести к развитию аллергических заболеваний. Кроме того, психологические стрессы вызывают изменения в функциональном комплексе таких структур мозга, как кора, гипоталамус, гипофиз, а также надпочечников и тимуса, что тоже влияет на функциональную активность иммунной системы (Газенко О.Г., Григорьев А.И. и др., 1986, Константинова И.В., 1988, Григорьев А.И., 2001, Dhabhar F.S., 2009, Morukov B., Rykova M. et al., 2011).

Воздействие на человека микрогравитации во время КП является новым стрессовым фактором для существ, обитающих в постоянном магнитном и гравитационном поле Земли (Morukov B., Rykova M. et al., 2011). Воздействие длительной микрогравитации может вызвать значительную дисрегуляцию иммунной системы с участием врожденного и специфического иммунитета (Taylor G.R. Janney R.P., 1992). Хотя точный патофизиологический механизм этой иммунологической дисрегуляции неизвестен, одной из причин может быть повышение уровня кортизола в сыворотке крови из-за стресса во время полета (O'Donnell P.M., Orshal J.M. et al., 2009, Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015).

Что касается экстраполяции данных о рисках для здоровья, с которыми сталкиваются космонавты, участвующие в космических полетах, Jang T.V. et al. (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015) считают, что наиболее выраженно будут проявляться аллергические симптомы и патологические реакции, опосредованные Т-хелперами 2 (Th2). Это необходимо учитывать и более тщательно оценивать у космонавтов во время предполетной подготовки (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015). Необходимо также

отметить, что на борту орбитальной станции и в герметично изолированных помещениях изменяется количественный и качественный состав микрофлоры, формируется специфический фон химических микропримесей в газовой среде за счет газовой выделения из оборудования и неметаллических материалов, продуцируемых человеком токсинов, а также за счет других источников, которыми могут служить пищевые и ингаляционные аллергены, содержащиеся в рационе питания и в атмосфере (Нефедов Ю.Г. Залогоев С.Н., 1967, Савина В.П. Кузнецова Т.И., 1980, Ильин В.К., Воложин А.И. и др., 2005).

3.1.1. Врожденный иммунный ответ

Врожденный иммунитет играет значительную роль в защите организма от патогенов и является первым звеном защиты от чужеродной агрессии. Исследования врожденного иммунного ответа проводились как в модельных экспериментах, так и в условиях подготовки и проведения космических миссий.

При изучении врожденного иммунитета в модельном эксперименте в условиях 5-суточной «сухой» иммерсии у части испытуемых на заключительном этапе воздействия и в период восстановления наблюдались негативные сдвиги, которые можно расценить как признак истощения резервов врожденной иммунной системы, что приводит к повышению риска развития различных инфекционных заболеваний, в том числе обусловленных условно-патогенной микрофлорой (Ильин В.К., Воложин А.И. и др., 2005, Пономарев С.А., Рыкова М.П. и др., 2011).

Было показано, что в результате воздействия факторов КП угнетается способность к повторным взаимодействиям с чужеродными клетками, способность распознавать и образовывать конъюгаты с клетками-мишенями, а также общая функциональная активность популяции естественных киллеров (Рыкова М.П., 1984, Мешков Д.О., 1990, Konstantinova I.V. Fuchs B.B., 1991, Schmitt D.A., Abbal M. et al., 1998, Мешков Д.О., 2001). Похожие изменения части показателей естественной цитотоксичности отмечались Г.Т. Сухих при исследовании влияния стресса на систему естественных киллеров (Сухих Г.Т., Меерсон Ф.З., 1983).

При исследовании экспрессии Toll-подобных рецепторов (TLR), а именно TLR2, TLR4, TLR6, нейтрофилами и моноцитами периферической крови у

испытателей в условиях «сухой» иммерсии на 5-е сутки пребывания в условиях иммерсии и в период восстановления (на 7-е сутки после выхода из иммерсионной ванны) было выявлено снижение содержания в периферической крови моноцитов и нейтрофилов, экспрессирующих TLR. Эти изменения можно рассматривать в качестве фактора риска развития воспалительных заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами (Пономарев С.А., Рыкова М.П. и др., 2011).

В исследовании Taylor G.R. et al. длительное воздействие опорной разгрузки снижало уровни эозинофилов и лимфоцитов в периферической крови, но значительно повышало уровень нейтрофилов (Taylor G.R., Neale L.S. et al., 1986).

Интересно, что увеличение количества нейтрофилов наблюдалось последовательно после КП. Ранее предполагалось, что микрогравитация, радиация и процесс посадки после КП приводили к увеличению количества нейтрофилов. Было неожиданным, что участники наземных модельных экспериментов тоже продемонстрировали увеличение содержания нейтрофилов в периферической крови, хотя и не было смоделировано процессов микрогравитации, радиоактивного излучения и посадки. Однако и участники модельных экспериментов («Марс-500»), и участники реальных космических полетов были подвергнуты воздействию другой окружающей среды после завершения своей миссии. Наличие большого количества воздействий новой внешней среды могло быть воспринято организмом как «угроза», похожая на системную инфекцию, и это стимулировало усиленную выработку нейтрофилов для борьбы с «системной» угрозой. Низкая целевая специфичность нейтрофилов может привести к гиперактивным иммунным ответам за счет снижения порога активации Т-хелперных клеток. Это может объяснить значительное усиление цитокиновых ответов, как против грибковых, так и против бактериальных антигенных стимуляций (Yi B., Rykova M. et al., 2015).

Исследование фенотипа поверхностных рецепторов гранулоцитов периферической крови не выявило существенных изменений популяционного состава CD11b⁺, CD18⁺, CD16⁻, CD24⁺ клеток, играющих важную роль в процессах распознавания патогена, адгезии и фагоцитоза (Пономарев С.А., Рыкова М.П. и др., 2011).

Таким образом, во время КП происходит модификация иммунного ответа, но выявленные изменения носят неоднозначный характер. Хотя количественных

изменений в нейтрофил-опосредованном звене врождённого иммунитета и не наблюдалось, но снижение экспрессии патоген-распознающих рецепторов свидетельствует о возможном снижении активности нейтрофилов в результате влияния неблагоприятных факторов КП, что также подтверждают данные о снижении активности естественных киллеров. Таким образом, вероятность формирования острого воспаления во время полета не велика, но ослабление защитных функций клеток, формирующих быстрый ответ на патоген, может привести к заражению и латентному течению заболеваний.

В случае развития воспалительных изменений, в том числе аллергической природы, также происходит ослабление врожденного звена иммунной системы, что делает человека более восприимчивым к вторичным бактериальным инфекциям (Morgan D.J., Casulli J. et al., 2018). Поэтому разработка лекарственных препаратов для профилактики развития или купирования приступов аллергического воспаления необходима для снижения риска вторичного инфицирования.

3.1.2. Адаптивный иммунный ответ

Исследования адаптивного иммунитета космонавтов и астронавтов, совершивших космические полеты различной продолжительности, позволили установить ряд негативных сдвигов, включающих изменение количественного содержания Т- и В-лимфоцитов, а также их функциональной активности, наблюдаемых в ранний послеполетный период (Константинова И.В., 1988, Konstantinova I.V., Rykova M.P. et al., 1993, Crucian B.E., Stowe R.P. et al., 2008, Morukov B., Rykova M. et al., 2011, Пономарев С.А., Рыкова М.П. и др., 2011).

Эксперименты на грызунах показали, что КП может влиять как на врожденную, так и на адаптивную иммунную систему, вызывая истощение и перераспределение пула В- и Т-клеток, изменение экспрессии генов и профилей цитокинов, а также массы лимфоидных желез, хотя результаты могут варьироваться в широких пределах (Pecaat M.J., Simske S.J. et al., 2000, Gueguinou N., Huin-Schohn C. et al., 2009). Отличия в результатах между различными экспериментами могут быть частично обусловлены относительно короткой продолжительностью большинства КП, когда

изменения происходят быстро и кратковременно, а также стрессами, связанными с посадкой (Crucian B., Simpson R.J. et al., 2014, Globus R.K. Morey-Holton E., 2016).

Более длительный 30-дневный эксперимент также показал появление признаков атрофии тимуса и селезенки, изменения в экспрессии цитокинов и увеличение экспрессии белков теплового шока БТШ72 и БТШ90α (Novoselova E.G., Lunin S.M. et al., 2015), хотя длительный период (13 часов) между посадкой и анализом образца, вероятно, повлиял на результаты экспрессии генов в этом исследовании. Более поздний эксперимент на МКС аналогичной продолжительности (37 дней), но с использованием другого аппаратного обеспечения и извлечением образцов на орбите, не выявил признаков атрофии лимфоидных органов по сравнению с наземным контролем (Globus R.K. Morey-Holton E., 2016).

3.1.2.1. Т-клеточный иммунный ответ

Длительные космические полеты вызывают выраженные изменения в популяции циркулирующих лейкоцитов. Общее количество лейкоцитов в ранний послеполетный период (R+1) увеличилось на 56% по сравнению с уровнем перед полетом. При этом отмечалось увеличение количества лимфоцитов на 50,1%, увеличение количества моноцитов на 172% и увеличение количества гранулоцитов на 63,5%. Доля Т-лимфоцитов (CD3⁺) и различных подклассов Т-клеток практически не изменялась в ранний послеполетный период после длительных (4-14 месяцев) миссий (Morukov B., Rykova M. et al., 2011).

Воздействие факторов КП приводило к снижению количества Т-лимфоцитов в периферической крови у части космонавтов (Leach C.S., Rambaut P.C. et al., 1974, Kimzey S.L., Johnson P.C. et al., 1976, Константинова И.В., 1988). Исследования иммунной реактивности у космонавтов, летавших на космических станциях в течение 4–14 месяцев, несмотря на индивидуальные различия и различия между полетами, показали снижение функциональной активности Т-лимфоцитов. После полетов в течение нескольких месяцев на орбитальных станциях «Салют-6» и «Салют-7» отмечалось снижение у 17 из 21 космонавта; аналогичные изменения наблюдались в 21 из 56 случаев на космической станции "Мир" (Константинова И.В. Антропова Е.Н., 1980, Константинова И.В., 1988, Konstantinova I.V., 1991, Konstantinova I.V.,

Rykova M.P. et al., 1993, Morukov B., Rykova M. et al., 2011). Однако механизмы, лежащие в основе дисфункции Т-клеточного иммунитета у космонавтов, еще предстоит выяснить.

При этом во время экспериментального воздействия в эксперименте «МАРС-500» содержание CD8⁺ цитотоксических Т-клеток в периферической крови либо не изменялось по сравнению с исходным уровнем, либо незначительно снижалось. Через 8 месяцев пребывания в условиях изоляции в рамках проводимого эксперимента наблюдалось значительное преобладание CD4⁺ Т-клеток, связанное как с увеличением количества «наивных» CD4⁺ Т-клеток (CD4⁺CD45RA⁺), так и CD4⁺ Т-клеток памяти (CD4⁺CD45RO⁺) (Моруков Б.В., Рыкова М.П. и др., 2013).

Исследование Morukov B. et al. показало снижение функции Т-лимфоцитов в ответ на ФГА после длительных космических полетов, однако на первые и седьмые сутки наблюдений после посадки содержание CD25, CD38, HLA-DR и CD95 маркеров активации Т-клеток практически не изменялось. У большинства обследованных космонавтов анализ ответа Т-клеток на ФГА *in vitro* выявил снижение пролиферации культуры стимулированных Т-лимфоцитов через 48 ч после длительных космических полетов по сравнению с фоновыми значениями. Наблюдались два основных типа реакции Т-клеток: первый тип – увеличение количества маркеров активации при уменьшении интенсивности пролиферации Т-клеток, второй тип – снижение числа маркеров активации при уменьшении интенсивности пролиферации Т-клеток (Morukov B., Rykova M. et al., 2011).

Одной из причин снижения функциональной активности Т-клеток, наблюдаемого у членов экипажа после КП, может быть значительное увеличение количества CD4⁺ CD25⁺ bright регуляторных клеток, которые подавляют различные типы клеток врожденного и адаптивного иммунитета, и увеличение общего количества циркулирующих лимфоцитов (Shevach E.M., 2002, Firan M., Dhillon S. et al., 2006).

Кроме того, отмечалось возникновение дисрегуляции внутриклеточной передачи сигнала в Т-клетках (Schwarzenberg M., Pippia P. et al., 1999, Boonyaratanakornkit J.B., Cogoli A. et al., 2005), что также приводит к нарушению их функциональной активности.

3.1.2.2. В-клеточный иммунный ответ

Во время проведения модельного эксперимента «Марс-500» у членов экипажа не наблюдалось снижения абсолютного и относительного содержания CD19⁺ лимфоцитов. Напротив, в отдельные периоды экспериментального воздействия отмечалось статистически достоверное повышение количества В-клеток в периферической крови (Моруков Б.В., Рыкова М.П. и др., 2013).

В исследовании Рыковой М.П. и соавт. определялось содержание IgG, IgA, IgM, IgE, специфических IgE-антител, а также интерлейкина-4 (IL-4) до и после орбитальных полетов длительностью 7-11 суток на МКС в сыворотке крови 10 космонавтов. После кратковременного пребывания в условиях КП в обследованной группе не отмечалось достоверных изменений уровней исследуемых иммуноглобулинов и IL-4 (Рыкова М.П., Герцик Ю.Г. и др., 2006). Это согласуется с результатами, полученными американскими исследователями (Kimzey S.L., Johnson P.C. et al., 1976), по данным которых уровень иммуноглобулинов классов А, М и G во время краткосрочных космических миссий соответствовал нормальным значениям.

В ряде исследований показано, что длительные КП влияют на экспрессию генов иммуноглобулинов (Boxio R., Dournon C. et al., 2005, Bascove M., Huin-Schohn C. et al., 2009, Huin-Schohn C., Gueguinou N. et al., 2013) и частоту соматических мутаций генов иммуноглобулинов (Bascove M., Gueguinou N. et al., 2011).

Spielmann G. et al. в своей работе провели оценку гуморального иммунитета, а именно количества и фенотипов В-клеток, а также сывороточных иммуноглобулинов и поликлональных свободных легких цепей иммуноглобулинов (СЛЦ), исследуя образцы крови астронавтов, взятые до, во время длительного (6 месяцев) КП и в период восстановления после завершения миссии. По данным авторов, не отмечалось влияния КП на количество и соотношение различных подтипов В-клеток, также не было различий в содержании каппа-СЛЦ между предполетными образцами и пробами, полученными во время полета и в период восстановления ($p > 0,05$). Незначительное снижение уровней лямбда-СЛЦ наблюдалось после возвращения на Землю ($p < 0,05$). Кроме того, уровни IgG и IgM оставались неизменными во время и после КП по сравнению с фоновыми значениями ($p > 0,05$). Следует отметить, что концентрации IgA в плазме были повышены во время полета по сравнению с

исходными и послеполетными значениями ($p < 0,05$). Полученные результаты показывают, что В-клеточный гомеостаз практически не меняется во время длительного КП (Spielmann G., Agha N.H. et al., 2019).

3.1.3. Цитокин-опосредованный гуморальный иммунный ответ

Иммунная система функционирует как сложный механизм, включающий взаимодействие различных клеток и гуморальных компонентов. Интеграция различных элементов иммунной системы в значительной степени зависит от информационной сигнализации, которая обеспечивается с помощью цитокинов. Это разнообразная группа сигнальных молекул, которая регулирует деятельность широкого спектра клеток и тканей, связываясь со специфическими мембранными рецепторами и запуская сигнальные внутриклеточные каскады. Регуляция иммунного ответа обеспечивается балансом цитокинов.

Предполагается, что дисфункция Т-клеточного иммунитета частично связана с дисбалансом цитокинов. Было показано, что космические полеты влияют на выработку и действие различных цитокинов (Konstantinova I.V., Rykova M.P. et al., 1993, Crucian B.E., Cabbage M.L. et al., 2000, Crucian B.E., Stowe R.P. et al., 2008).

В исследовании Mehta et al. обнаружили связь между изменением уровней цитокинов и увеличением числа случаев инфекционных заболеваний среди членов экипажа (Mehta S.K., Crucian B.E. et al., 2013). Возможной причиной этого может являться сдвиг профиля цитокинов с Th1 в сторону Th2.

В работе Morukov V. et al. (Morukov V., Rykova M. et al., 2011) было обнаружено значительное смещение в сторону Th2-ответа со снижением выработки IFN- γ после полета и увеличением продукции IL-10. Эти данные подтверждают результаты, полученные Crucian et al., в котором смещение в сторону Th2 ответа наблюдалось после полета у членов экипажа МКС (Crucian B., Stowe R. et al., 2013).

Баланс цитокинов Th1/Th2 необходим для адекватной поддержки иммунного ответа. Отношение IFN- γ /IL-10, вероятно, является индикатором баланса Th1/Th2. Анализ продукции цитокинов в ФГА-стимулированных клеточных культурах показал разнонаправленные изменения продукции цитокинов Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF-b) и Th2 (IL-10, IL-4, IL-5), а также концентраций IL-1b, IL-6 и IL-8 в супернатантах в течение

первой недели после посадки по сравнению с предполетными данными после длительных (4-14 месяцев) полетов (Morukov B., Rykova M. et al., 2011).

В модельном эксперименте «Марс-500» на этапе «возвращения экипажа с Марса к Земле» особенностью цитокинового профиля также являлось развития дисбаланса цитокинов в сторону Th2 гуморального ответа (Моруков Б.В., Рыкова М.П. и др., 2013).

Фактически, аллергические заболевания, в особенности астма и ринит, связаны с обострением Th2 иммунного ответа. По этой причине изменение баланса цитокинов с Th1 в сторону Th2 может привести к возникновению инфекционных заболеваний и аллергических нарушений (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015). Следовательно, качественные изменения могут стать продолжением количественных изменений в системе иммунных взаимодействий. Дефицит или избыток иммунных медиаторов, таких как цитокины, может привести к низкой активности Т-клеток и может быть ранним предиктором предрасположенности к развитию аллергических заболеваний.

Таким образом, характер и интенсивность ответа на внешний раздражитель зависит от функциональных резервов системы. Выявленные в модельных экспериментах на заключительном этапе воздействия и в восстановительный период негативные сдвиги в системе естественного иммунитета у некоторых испытуемых можно расценивать как признак истощения резервов иммунной системы и увеличение риска развития инфекционных заболеваний различной этиологии и аллергических расстройств. Особенно возрастает риск возникновения заболеваний, обусловленных условно-патогенной микрофлорой, не вызывающей в обычных условиях патологических реакций со стороны организма хозяина (Пономарев С.А., Рыкова М.П. и др., 2011).

3.2. Модельные эксперименты с антиорто статическим вывешиванием

Модель опорной разгрузки была разработана в Институте медико-биологических проблем рабочей группой под руководством Е.А. Ильина (Ильин Е.А. Новиков В.Е., 1980) для оценки влияния условий, аналогичных условиям КП, на скелетно-мышечную систему. Аналогичная модель, параллельно с советскими учеными, была предложена в Национальном исследовательском центре США по

исследованиям в области аэронавтики и космонавтики (НАСА), отличающаяся некоторыми техническими деталями (Morey-Holton E.R. Globus R.K., 2002). Она до сих пор широко используется для анализа влияния опорной разгрузки на интегрированные физиологические, органоспецифические и механистические реакции. Помимо скелетно-мышечной системы было описано влияние опорной разгрузки и на другие системы организма, в том числе кардиоваскулярную, иммунную, сердечно-сосудистую, дыхательную, нервную системы, на зрение, стресс-опосредованные реакции, заживление ран (Temple M.D., Kosik K.S. et al., 2002, Gaignier F., Schenten V. et al., 2014, Globus R.K. Morey-Holton E., 2016, Zwart S.R., Gregory J.F. et al., 2016). При этом происходит перераспределение жидких сред организма в краниальном направлении, атрофия мышечного аппарата нижних конечностей, изменения в работе зрительного анализатора (Genc K.O., Gopalakrishnan R. et al., 2010, Mader T.H., Gibson C.R. et al., 2011, Momken I., Stevens L. et al., 2011, Mao X.W., Pecaut M.J. et al., 2013).

При антиортостатическом вывешивании может происходить нарушение целостности эпителиального барьера желудочно-кишечного тракта с попаданием патогенных и условно-патогенных микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта в кровотоки, что может приводить к эндопортальной токсемии как у крыс, так и у мышей (Rivera C.A., Tchamtchi M.H. et al., 2003). У молодых мышей вывешивание вызывает бактериальную транслокацию из просвета кишечника и ухудшает способность отвечать на бактериальные инфекции, что усугубляется при облучении в случае имитации действия космической радиации (Zhou Y., Ni H. et al., 2012, Li M., Holmes V. et al., 2014).

Преимущества животных моделей с опорной разгрузкой нижних конечностей включают: 1) возможность выполнять различные процедуры (например, воздействие радиации, патогенных микроорганизмов и лекарственных препаратов), которые невозможно исследовать на людях по этическим соображениям или на животных в условиях КП из-за ограниченных возможностей экспериментатора во время полета, а также и ряда других ограничений; 2) хорошо охарактеризованные изменения в ответ на вывешивание для некоторых систем органов; 3) наличие определенных чистых линий животных; 4) возможность изучать процесс восстановления после возвращения в условия нормальной опорной нагрузки (Globus R.K. Morey-Holton E., 2016).

К недостаткам модели антиортостатической гипокинезии в качестве аналога КП в том виде, в котором она в настоящее время применяется, можно отнести: 1) непостоянные стрессовые реакции в ответ на опорную разгрузку в зависимости от эксперимента; 2) продолжающуюся гравитационную нагрузку на передние конечности; 3) отсутствие ясности относительно влияния опорной разгрузки на позвоночник (Globus R.K. Morey-Holton E., 2016).

Опорная разгрузка вызывает генерализованную и, возможно, кратковременную активацию иммунной системы. Факторы, которые могут опосредовать индуцированные антиортостатическим положением изменения функции иммунной системы, включают антиортостаз, стресс (активация симпатической нервной и/или гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы) и гиподинамию (Globus R.K. Morey-Holton E., 2016). Однако, по данным Gaignier et al. (Gaignier F., Schenten V. et al., 2014), после 21-суточного антиортостатического вывешивания не отмечалось различий между концентрациями кортикостерона в исследуемой и контрольной группах. Перераспределение жидкости также влияет на клеточный состав лимфоидных органов и митогенный ответ лимфоцитов (Chapes S.K., Mastro A.M. et al., 1993), что приводит к снижению устойчивости к инфекциям (Aviles H., Belay T. et al., 2003, Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015).

Происходит перераспределение иммунных клеток, ухудшение В-клеточного лимфопоэза в костном мозге (Gaignier F., Schenten V. et al., 2014, Lescale C., Schenten V. et al., 2015) и функциональной активности Т-клеток (Nash P.V., Konstantinova I.V. et al., 1992). При этом отмечено усиление устойчивости к первичной инфекции *Listeria monocytogenes*, но снижение долгосрочной устойчивости, опосредованной Т-клетками памяти (Miller E.S. Sonnenfeld G., 1993, 1994). Gaignier et al. (Gaignier F., Schenten V. et al., 2014) сообщают о тенденции к уменьшению общего количества лимфоцитов при длительном вывешивании (21 сутки), при этом отмечалось резкое уменьшение абсолютного количества В-клеток в селезенке, в то время как абсолютное количество Т-клеток оставалось неизменным. При этом резко снизилось соотношение В-/Т-клеток, а соотношение $CD4^+/CD8^+$ Т-клеток снизилось с 1,6 до 1,2. Wei et al. (Wei L.X., Zhou J.N. et al., 2003) наблюдал снижение количества спленоцитов примерно на 50% со второго дня вывешивания, которое опосредовалось апоптозом и перераспределением лейкоцитов.

Снижение В-лимфопоэза было обнаружено в короткие сроки после начала вывешивания и в течение 21-суточной опорной разгрузки количество предшественников В-клеток оставалось низким. При этом в популяции гемопоэтических стволовых клеток или мультипотентных гемопоэтических клеток изменений обнаружено не было. Снижение уровня В-лимфопоэза наблюдалось на стадии общего лимфоидного предшественника с основным блоком при переходе В-клеток предшественников в пролимфоцит (Lescale C., Schenten V. et al., 2015).

Дифференцировка в направлении В-клеток из гемопоэтических стволовых клеток зависит от взаимодействия со стромальными элементами красного костного мозга и регулируется сигналами IL-17, а также сетью транскрипционных факторов. Снижение интенсивности лимфопоэза в условиях опорной разгрузки было связано с уменьшением экспрессии EBF и PAX5 факторов регуляции ранней В-клеточной дифференцировки, которые являются одними из ключевых, и изменением STAT5-опосредованной передачи сигналов IL-7 (Lescale C., Schenten V. et al., 2015).

При опорной разгрузке помимо изменения клеточного звена иммунной системы, отмечались также изменения в гуморальной регуляции иммунного ответа. Так, при вывешивании показано увеличение секреции IL-6, ГМ-КСФ, IFN γ , но отсутствие изменений в концентрациях TNF- α и IL-10 по сравнению с контрольной группой (Gaignier F., Schenten V. et al., 2014).

Влияние моделируемой микрогравитации на уровни IFN γ остается спорным: в исследовании Gaignier et al. (Gaignier F., Schenten V. et al., 2014) IFN γ продемонстрировал незначительную тенденцию к увеличению при стимуляции LPS после воздействия антиортостатического вывешивания, а в ConA-стимулированных лимфоцитах отмечалась незначительная тенденция к его снижению. Felix et al. (Felix K., Wise K. et al., 2004) сообщили, что после длительного воздействия опорной разгрузки уровни IFN γ были значительно снижены в сыворотке, слегка снижены в лимфатических узлах, но не были существенно изменены в тканях селезенки.

Jang et al. (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015) в своем исследовании моделировали АДП с двухнедельным антиортостатическим вывешиванием на этапе индукции локального иммунного ответа. Авторы показали, что количество нейтрофилов в БАЛ было увеличено по сравнению с контрольной группой и группой с АДП, индуцированным в условиях нормальной нагрузки. При этом доля эозинофилов в

БАЛ снижалась по сравнению с группой с индуцированным АДП в условиях нормальной нагрузки, но при гистологическом исследовании отмечалась выраженная инфильтрация легочной ткани воспалительными клетками. Также наблюдалось выраженное снижение уровня IL-10 по сравнению с группой с АДП в условиях нормальной опорной нагрузки, что свидетельствует о дисрегуляции иммунной системы в условиях вывешивания.

3.3. Аллергическое воспаление дыхательных путей

Аллергическое воспаление дыхательных путей является хроническим заболеванием, сложно поддающимся классификации вследствие широкого спектра клинических проявлений в зависимости от генетических и физиологических особенностей организма, а также образа жизни пациента, факторов окружающей среды и отвечаемости на различные терапевтические подходы. В первом приближении выделяют два подтипа заболевания: первый характеризует аллергическая сенсibilизация, проявляющаяся в повышенном уровне общего и аллергенспецифического уровня IgE в сыворотке периферической крови, а также положительным кожным тестом на аллергены клещей домашней пыли, пыльцевые аллергены, споры грибов и некоторые другие. Это комплексное заболевание, основной характеристикой которого является пролиферация Т-хелперов 2 (Th2) в ответ на вдыхаемые аэроаллергены (Afshar R., Medoff B.D. et al., 2008). Второй подтип имеет неаллергическую природу, при которой специфического уровня IgE и пролиферации Th2 клеток не наблюдается (Anderson G.P., 2008, Wenzel S.E., 2012).

Приток эозинофилов, гиперплазия бокаловидных клеток, приводящая к обструкции дыхательных путей, бронхиальная гиперчувствительность при воздействии неспецифических стимулов, а также повышение уровней проаллергических гуморальных факторов, таких как IL-4, -5, -13 и IgE – все это является следствием активации и неконтролируемой пролиферации Th2. Типичным признаком аллергической природы АДП также является повышенный уровень IgE, что объясняется воздействием IL-4 на В-клетки, при котором происходит переключение на синтез IgE. Однако данный показатель не уникален для этого заболевания, так как характеризует многие другие заболевания аллергической

природы (Woodruff P.G., Modrek B. et al., 2009). Еще одним признаком аллергического воспаления является появление эозинофилии в легких, которая также не является специфическим маркером, а характерна для любого хронического обструктивного процесса в легких. У людей АВДП клинически проявляется в виде астматических приступов. Далее будет рассмотрен механизм сенсibilизации и развития воспаления при АВДП, а также роль различных клеточных факторов в поддержании воспаления.

3.3.1. Сенсibilизация

Аллергическая сенсibilизация является результатом сложного взаимодействия между аллергеном и организмом-хозяином в определенных экологических условиях. Применительно к АВДП под сенсibilизацией понимают формирование пула аллерген-специфичных Т-клеток (Th2 типа) и последующую клональную пролиферацию этих клеток при повторной встрече с аллергеном (Woodruff P.G., Modrek B. et al., 2009).

Аллергическая сенсibilизация, индуцируемая экзогенными аллергенами, является результатом длительного воздействия на человеческий организм этих молекул. Хотя внутренние свойства экзогенных белков и сопутствующие факторы окружающей среды имеют значение в формировании аллергического воспаления, все же иммунный статус организма-хозяина играет определяющую роль в том, что не у каждого человека, подвергающегося воздействию аллергенов, развивается аллергия. Предрасположенность к развитию аллергии является результатом сложного мультифакторного взаимодействия генов и окружающей среды. Для понимания иммунобиологических механизмов формирования сенсibilизации необходимо изучение всех элементов, принимающих участие во взаимодействии аллергена с барьерными тканями и клетками иммунной системы при попадании аллергена в организм, включая специализированные антиген-презентирующие клетки (АПК), представленные преимущественно дендритными клетками (ДК), а также Т-хелперы и В-клетки (van Ree R., Hummelshoj L. et al., 2014).

Первый барьер, который встречает аллерген в процессе сенсibilизации, это эпителий слизистой оболочки. В воздухоносных путях эпителий обеспечивает обмен

газов и создает физический, химический и иммунологический барьер (van Ree R., Hummelshoj L. et al., 2014). Эпителиальный барьер обеспечивает иммунологическую защиту посредством экспрессии рецепторов врожденного иммунитета, в том числе патоген распознающие рецепторы (PRR). Активация эпителиальных клеток через PRR в ответ на воздействие бактерий, вирусов или грибов ведет к выбросу медиаторов и ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMP), воздействующих на расположенные под базальной мембраной иммунные клетки и вызывая развитие воспалительного ответа. Таким образом, эпителиальные клетки контролируют множество иммунных клеток подлежащих мезенхимальных тканей, включая ДК, тучные клетки, эозинофилы и Т-клетки, принимающих участие как в реакциях врожденного, так и приобретенного иммунитета (Swindle E.J., Collins J.E. et al., 2009).

При аллергическом воспалении увеличивается проницаемость эпителия, который становится более восприимчивым к внешним триггерам. На поверхности эпителиальных клеток расположены рецепторы врожденного иммунитета, такие как Toll-подобные и протеаза-активируемые рецепторы, которые при взаимодействии с аллергенами и ко-факторами из окружающей среды стимулируют клетки продуцировать цитокины, в том числе активирующие Th2-ответ у предрасположенных к аллергии людей (Schleimer R.P., Kato A. et al., 2007).

Существует несколько механизмов проникновения белковых молекул через нарушения в компонентах физического, химического и иммунологического эпителиального барьера. Некоторые аллергены, как например, клещи домашней пыли, имеют протеазы, которые могут повреждать физический барьер, воздействуя непосредственно на белки плотных контактов (Wan H., Winton H.L. et al., 1999, Post S., Nawijn M.C. et al., 2012). Известно, что патогены (вирусы, бактерии, грибы) и воздействие окружающей среды (сигаретный дым, выхлопные газы и другие продукты техногенного загрязнения) могут разрушать физический барьер (Glader P., Moller S. et al., 2006, Sajjan U., Wang Q. et al., 2008). Активация химического барьера тоже может быть вызвана факторами внешней среды, а также цитокинами, синтезированными организмом-хозяином, например, IL-13, увеличивающим продукцию слизи (Atherton H.C., Jones G. et al., 2003). Затем прямое воздействие аллергенов через протеаз-активируемые рецепторы (PAR) и патогенов через

воздействие на PRR вызывают активацию иммунологического барьера посредством выброса провоспалительных медиаторов и привлечения клеток иммунной системы (van Ree R., Hummelshoj L. et al., 2014).

Нервные волокна отвечают за возникновение гиперчувствительности дыхательных путей, в результате которой возникает бронхоспазм (Nassenstein C., Schulte-Herbruggen O. et al., 2006). При развитии АВДП PGP^+ и $CGRP^+$ нервные окончания тесно контактируют с эпителиальными клетками, образуют нейроэпителиальные узлы (Weichselbaum M., Sparrow M.P. et al., 2005, Veres T.Z., Rochlitzer S. et al., 2007) и участвуют в ремоделировании дыхательных путей. В подэпителиальном пространстве бронхов также были обнаружены скопления ДК, активированных Т-клеток и нервных окончаний, формирующие функциональные кластеры (Veres T.Z., Shevchenko M. et al., 2009), что позволяет сделать предположение о существовании зон активации Т-клеток в тканях (вне лимфатических узлов).

После проникновения через эпителиальный барьер аллерген распознается ДК, представленными плазмоцитоидными ДК, двумя популяциями вида классических ДК ($CD11b^+$ и $CD11b^-$), и моноцитарными ДК. Известно, что классические $CD11b^+$ ДК и моноцитарные ДК являются провоспалительными клетками и направляют наивные (незрелые) Т-клетки в сторону Th2. Тимический стромальный лимфопротейн (TSLP), цитокин, который секретируется в больших количествах эпителиальными и тучными клетками больных астмой, играет важную роль в созревании миелоидных ДК и в привлечении Th2 в дыхательные пути посредством выброса CCL17 (так же известного как TARC) и CCL22 (известного как monocyte-derived chemokine, моноцитарный хемокин), который связывается с CCR4 рецептором, селективно экспрессирующемся на Th2 (Barnes P.J., 2008).

Наравне с двумя доминантными популяциями Т-клеток Th1 и Th2, взаимно подавляющими дифференцировку по противоположному пути, в настоящее время выделяют спектр различных популяций Т-хелперов, которые вместе направляют или контролируют различные аспекты аллергического воспаления и имеют достаточно гибкий цитокиновый профиль. Т-хелперы включают следующие субпопуляции клеток в дополнение к Th1 и Th2: Th9, Th17, Th22 и Treg (регуляторные Т-клетки). Набор цитокинов, секретируемых ДК, определяет, какой подтип будет

доминирующим (van Ree R., Hummelshoj L. et al., 2014). Легочные ДК контролируют поляризацию Т-хелперов в направлении Th1, Th2 или Th17 ответа, или наоборот, предотвращают возникновение повреждающего иммунного ответа на ингаляционные аллергены посредством индукции регуляторных Т-клеток (van Ree R., Hummelshoj L. et al., 2014).

Сообщалось, что абляция дендритных клеток во время эффекторной фазы сенсibilизации при развитии аллергического ответа приводит к отсутствию характерных особенностей астмы, таких как приток эозинофилов, выработка Th2 цитокинов и бронхиальной гиперреактивности (van Rijt L.S., Jung S. et al., 2005). Однако, в ответ на вирус гриппа, депляция ДК ведет к увеличению титров вирусных частиц и уменьшению количества вирус-специфических CD8 Т-клеток (GeurtsvanKessel C.H., Willart M.A. et al., 2008). Эти данные говорят о том, что хотя уменьшение количества ДК могут способствовать лечению астмы, этот подход небезопасен и может нарушать ответ организма на патогены (van Ree R., Hummelshoj L. et al., 2014). Поэтому изучение роли конкретных субпопуляций ДК при определенных заболеваниях и воздействие на определенные подтипы клеток может быть лучшей альтернативой в разработке терапевтических подходов.

При доминирующей секреции IL-4 и/или IL-13 ДК происходит переключение В-клеток на выработку IgE, этот процесс более активно протекает в молодом возрасте. Было показано, что IgE-продуцирующие плазматические клетки являются долгоживущими, располагаются в красном костном мозге или воспаленных тканях, где они не могут быть легкой мишенью для терапевтического воздействия (van Ree R., Hummelshoj L. et al., 2014).

Таким образом, аллергическая сенсibilизация – это сложное взаимодействие между аллергеном, его окружением и врожденной и приобретенной иммунной системой организма-хозяина, смещенной в сторону аллергического воспаления.

3.3.2. Субпопуляции ДК

ДК могут быть разделены на несколько подтипов в зависимости от их локализации и экспрессии поверхностных маркеров (Lambrecht B.N., 2005). На настоящий момент в легких описаны четыре популяции ДК, некоторые из которых

происходят из разных клеток-предшественников. Популяция ДК происходит из костного мозга, при этом макрофаги и предшественники ДК имеют общего предшественника. На поздних стадиях из ДК-предшественников образуются моноцитарный и плазмоцитарный ростки. Из плазмоцитарного ростка образуются плазмоцитоидные ДК (подтип 1) и предшественники классической субпопуляции ДК, из которых происходят CD11b⁺ (подтип 2) и CD11b⁻ популяции классических ДК, последние из которых экспрессируют CD103 и лангерин (подтип 3). Данные различных авторов свидетельствуют о родстве CD8⁺ ДК и CD103⁺ ДК дермы, легких, кишечника и печени. Интересно, что CD103⁺ дермальные ДК и CD8⁺ ДК селезенки специализируются на кросс-презентации антигенов, что также характерно для CD103⁺ субпопуляции ДК легких (Liu K., Victora G.D. et al., 2009). В условиях воспаления продуцируются цитокины и хемокины, привлекающие моноциты в очаг воспаления. Моноциты могут развиваться в CD11b⁺ воспалительные ДК (подтип 4). Показано, что воспалительные ДК экспрессируют маркер Ly6C, который свидетельствует об их моноцитарном происхождении, но после дифференцировки они постепенно утрачивают экспрессию Ly6C и впоследствии становятся неотличимы от субпопуляции классических CD11b⁺ ДК. Таким образом, для различия подтипов ДК после их притока в ответ на действие аллергена, например, клещей домашней пыли, необходимы дополнительные маркеры. В недавних исследованиях показано, что субпопуляция привлеченных CD11b⁺ ДК экспрессирует FcεR1 рецептор (Hammad H., Plantinga M. et al., 2010). То есть экспрессия высокоаффинных рецепторов IgE может быть полезна в идентификации моноцитарных воспалительных ДК в легких.

В зависимости от локализации относительно эпителиального барьера различают межэпителиальные и подэпителиальные ДК, при этом межэпителиальные имеют разветвленные отростки/дендриты, проникающие между эпителиальными клетками в просвет дыхательных путей. Подэпителиальные клетки имеют амебоидную форму и расположены ниже в подэпителиальном пространстве (von Garnier C., Wikstrom M.E. et al., 2007, Stumbles P.A., Strickland D.H. et al., 2009). Veres et al. (Veres T.Z., Voedisch S. et al., 2013) косвенно показали, что эти две популяции также различаются по экспрессии CD103 и CD11b. Для межэпителиальных ДК характерна экспрессия CD103 в отсутствие CD11b. Подэпителиальные можно охарактеризовать как CD103⁻CD11b⁺. И межэпителиальные, и подэпителиальные ДК

способны пролиферировать на периферии, причем в условиях воспаления (в частности, после ингаляции аллергена) пролиферативная активность увеличивается (Veres T.Z., Voedisch S. et al., 2013).

Таким образом, ДК играют важную роль при активации адаптивного иммунного ответа, в том числе и проаллергического, а следовательно, могут рассматриваться в качестве клеток-мишеней для терапевтического воздействия при поиске подходов к предотвращению или супрессии АДП.

3.3.3. Развитие воспаления в дыхательных путях

В развитии заболевания принимают участие как конститутивные клетки, такие как эпителий, мышечные клетки и нервные окончания, так и клетки иммунной системы. При АДП секретируется множество цитокинов и хемокинов, они регулируются транскрипционным ядерным фактором κB (NF- κB), который активируется в эпителиальных клетках дыхательных путей и макрофагах и играет значительную роль в развитие аллергического воспаления (Barnes P.J., 2008). Предполагают, что активация клеток гладкой мускулатуры дыхательных путей происходит при массовом выделении контрактильных медиаторов, сопровождающем активацию клеток, лежащих в непосредственной близости от клеток гладкой мускулатуры. В частности, выделяемые активируемыми тучными клетками простагландины (PGF 2α , PGD 2) и лейкотриены (LTC 4 , LTD 4 , LTE 4) способны взаимодействовать с простагландиновыми рецепторами на поверхности мышечных клеток (Bentley J.K. Hershenson M.B., 2008).

Аллергический иммунный ответ характеризуется эозинофилией, гиперпродукцией IgE и Т-клеточным ответом с секрецией IL-4, IL-5 и IL-13. Недавно стало известно, что IL-9, IL-22 и IL-17 также принимают участие в развитии аллергического воспаления. До сих пор нет окончательной ясности, стоит ли включать в аллергический фенотип подтипы CD4⁺ Т-клеток (Th9, Th22 и Th17), секретирующие эти цитокины. Не у всех подтипов имеются уникальные маркеры дифференцировки. Вероятнее, вместо этого существуют «кассеты» стимул-ответ-цитокин, существующие в одной и той же CD4⁺ клетке. Примером такой «кассеты» могут служить цитокины семейства IL-1 (IL-1 β , IL-18 и IL-33), которые могут

модулировать экспрессию IL-9 и IL-10 других подтипов Т-клеток (Blom L. Poulsen L.K., 2012, Liu J., Harberts E. et al., 2014). Другие аналогичные модулирующие цитокины – это TSLP и IL-25, которые наряду с некоторыми другими факторами приводят к формированию фолликулярных Т-хелперов, которые, как полагают, играют важную роль в В-клеточной дифференцировке (Paul W.E. Zhu J., 2010, Tangye S.G., Ma C.S. et al., 2013).

Ключевое событие в патогенезе аллергии это выработка IgE-антител. Антитела секретируются плазматическими клетками и их предшественниками, плазмобластами, а также В-клетками. IgE соединяется с высокоаффинным Fc рецептором (FcεRI) на поверхности тучных клеток и базофилов, а также с низкоаффинным Fc рецептором (FcεRII) на поверхности В-клеток, макрофагов и, возможно, эозинофилов. IL-4 и IL-13, секретируемые Th2, вызывают переключение классов иммуноглобулинов на продукцию IgE. Блокирование IgE с помощью моноклональных антител (омализумаб) приводит к уменьшению выраженности ответа на аллергены, тяжести воспаления дыхательных путей, частоты обострений, что говорит о важной роли IgE в патогенезе заболевания (Barnes P.J., 2008). В течение длительного времени считалось, что плазматические клетки являются короткоживущим конечным этапом дифференцировки В-клеток. Однако современные исследования утверждают наличие долгоживущих резидентных плазматических клеток, располагающихся в специальных «нишах выживания», обнаруженных в красном костном мозге и в воспаленных тканях (Medina F., Segundo C. et al., 2002). После того, как долгоживущие плазматические клетки полностью сформировались, они тяжело поддаются терапевтическому воздействию, поскольку они устойчивы к иммуносупрессии и облучению (Luger E.O., Fokuhl V. et al., 2009, Mohr E., Serre K. et al., 2009).

Тучные клетки играют важную роль в патогенезе АВДП, поскольку при активации они секретируют гистамин, лейкотриены C4, D4, E4 и простагландин D2, вызывающие бронхоспазмы. Приток тучных клеток слизистой оболочки на поверхность дыхательных путей происходит под действием фактора стволовых клеток (stem-cell factor, SCF), также известного как КИТ-лиганд, высвобождаемого эпителиальными клетками, и взаимодействующим с КИТ-рецепторами, экспрессируемыми тучными клетками (Bradding P., Walls A.F. et al., 2006, Reuter S.,

Stassen M. et al., 2010). Для тучных клеток характерна продукция как проаллергических, так и провоспалительных цитокинов: IL-1, -2, -3, -4, -5, -13, GM-CSF, IFN γ , а TNF- α (Barnes P.J., 2008, Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В. и др., 2011), а также хемотаксических агентов, в частности IL-8 (Reuter S., Stassen M. et al., 2010).

При попадании в легкие патогена или аллергена в течение короткого времени начинается миграция нейтрофилов в очаг воспаления (Kohler A., De Filippo K. et al., 2011). Способность выходить на периферию характеризует нейтрофилы, как клетки острой фазы воспаления, в том числе и при развитие острой фазы АВДП (Nakagome K., Matsushita S. et al., 2012). В мокроте больных астмой отмечается увеличенное количество нейтрофилов по сравнению со здоровыми людьми. Приток нейтрофилов вызван увеличением продукции СХС-хемокинов: СХС-хемокиновый лиганд 1 (CXCL1, так же известный как GRO α) и CXCL8 (известный как IL-8), которые воздействуют на рецептор CXCR2, экспрессирующийся преимущественно нейтрофилами (Nakagome K., Matsushita S. et al., 2012).

У курящих пациентов и больных с тяжелыми формами астмы отмечается рост количества нейтрофилов, увеличение количества CXCL8 и фактора некроза опухоли, усиливается оксидативный стресс. Нейтрофильное воспаление может быть вызвано IL-17, вырабатываемым Th17, который приводит к выбросу хемокина CXCL8 эпителиальными клетками (Kohler A., De Filippo K. et al., 2011).

Отличительной особенностью АВДП является перераспределение клеточного состава инфильтрата в сторону эозинофилов. Несмотря на то, что между активацией Th2 и притоком эозинофилов в дыхательные пути можно проследить четкую взаимосвязь, основанную на гуморальной регуляции, в том числе с помощью IL-5, оказалось, что эозинофил-опосредованное воспаление в дыхательных путях может быть индуцировано и в отсутствии зрелых Т-клеток и, соответственно, в отсутствии Th2-ответа. Основное повреждающее воздействие эозинофилов обусловлено их дегрануляцией в результате кросс-связывания их поверхностных рецепторов Fc ϵ RI с циркулирующими IgE (Turner H. Kinet J.P., 1999). На настоящий момент доказано, что в отсутствии аллерген-индуцированной клональной пролиферации Th2 за активацию эозинофилов ответственны врожденные лимфоидные клетки второго типа, при дифференцировке которых ключевую роль играет транскрипционный фактор ROR α (Lambrecht B.N. Hammad H., 2015). При этом продукция Th2-типа цитокинов,

преимущественно IL-5 и IL-13 и в меньшей степени IL-4, характерна лишь для активированных лимфоидных клеток врожденной иммунной системы второго типа. Для активации необходима секреция TSLP, IL-25 и IL-33, источником которых являются эпителиальные и ДК (Lloyd C.M. Saglani S., 2013, Walker J.A., Barlow J.L. et al., 2013). Таким образом, для развития воспалительного процесса в дыхательных путях необходима комплексная последовательная активация структурных и иммунных клеток респираторного тракта.

3.3.4. Врожденные лимфоидные клетки

Долгое время считали, что без клональной пролиферации Th2 в ответ на аллерген аллергическая реакция развиваться не может. Однако Brussel et al. (Brusselle G.G., Maes T. et al., 2013) показали, что у мышей, нокаутных по RAG-рекомбиназе, в ответ на ингаляцию аллергена – экстракта домашней пыли, развивается эозинофилия дыхательных путей, поскольку отсутствие RAG-рекомбиназы приводит к отсутствию зрелых T- и B-клеток, а следовательно и Th2, способных распознать аллерген. Дальнейшие исследования показали, что развитие АДП в отсутствие адаптивного иммунитета происходит благодаря врожденным лимфоидным клеткам. Лимфоидные клетки врожденной иммунной системы второго типа были описаны ранее как не T- и не B-эффекторные клетки в различных моделях Th2-опосредованных заболеваний (Mjosberg J. Spits H., 2012). Как и Th2, они способны продуцировать IL-5 и IL-13, но не IL-4. В развитии и активации врожденных лимфоидных клеток важную роль играют IL-25 и IL-33. Кроме того, на поверхности этих клеток обнаружен лейкотриеновый рецептор, что подтверждает возможность активации лимфоидных клеток врожденной иммунной системы при аллергическом воспалении в результате секреции лейкотриенов тучными клетками. Последние исследования, проводимые на моделях аллергического воспаления с использованием мышей, показали, что более половины продукции Th2-ассоциированных цитокинов секретируется лимфоидными клетками врожденной иммунной системы и что в отсутствии последних проявления индуцированного аллергического воспаления значительно ослаблены (Yu S., Kim H.Y. et al., 2014).

Таким образом, при подавлении адаптивного звена иммунитета в условиях КП развитие и поддержание воспаления дыхательных путей возможно при участии врожденных лимфоидных клеток.

3.3.5. Гистологическая картина при АДП

В бронхиальных биоптатах, взятых у пациентов, страдающих АДП, отмечается эозинофильная инфильтрация, активированные тучные клетки слизистой оболочки на поверхности дыхательных путей и активированные Т-клетки. Определяются характеристические структурные изменения, такие как коллагеновые депозиты под эпителием, которые часто описываются как утолщение базальной мембраны и обнаруживаются у всех больных АДП. Утолщение слоя гладкомышечных волокон дыхательных путей наблюдается в результате гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон, что, как правило, встречается у пациентов с тяжелыми формами АДП. С использованием моделей АДП было обнаружено, что при продолжительной ингаляции аллергена происходит утолщение мышечного слоя главных бронхов. В исследованиях *in vitro* была показана способность мышечных клеток пролиферировать и мигрировать под действием компонентов экстрактов аллергенов и гуморальных факторов, характерных для аллергического воспаления, не только продуцируемых тучными клетками, но и таких как проаллергические цитокины IL-5 и IL-13. Также обнаружена способность тучных клеток в процессе аллергического воспаления мигрировать и накапливаться в ткани гладкой мускулатуры, образуя структуры на подобии нейроэпителиальных узлов, упомянутых ранее. И, как и в случае нейроэпителиальных ганглиев, в структурах, образованных тучными клетками и гладкой мускулатурой, обнаружены ассоциированные Т-клетки. Опираясь на приведенные выше данные, предполагают, что мышечные клетки также подвергаются ремоделированию в процессе АДП (Ozier A., Allard B. et al., 2011).

В биоптатах пациентов, страдающих этим заболеванием, определяются слущенные эпителиальные клетки, поскольку эпителиальный слой более рыхлый и клетки легче отделяются от базальной мембраны во время процедуры биопсии. Кроме того, обнаруживается увеличение количества кровеносных сосудов (ангиогенез) в ответ на повышенную секрецию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

Гиперплазия слизистой оболочки тоже обнаруживается в биоптатах пациентов с АВДП с увеличением количества секретирующих слизь бокаловидных клеток эпителия и увеличением размеров подслизистых желез (Barnes P.J., 2008).

Таким образом, при развитии АВДП гистологическая картина указывает на вовлечение большого количества различных компонентов, что дает представление о взаимодействии элементов иммунной системы с конститутивными клетками респираторного тракта. Кроме того, гистологическая картина позволяет судить о тяжести заболевания, что является дополнительным критерием при постановке экспериментальных моделей при стертых проявлениях заболевания, слабо выраженном клеточном или гуморальном ответе (Рис. 1).

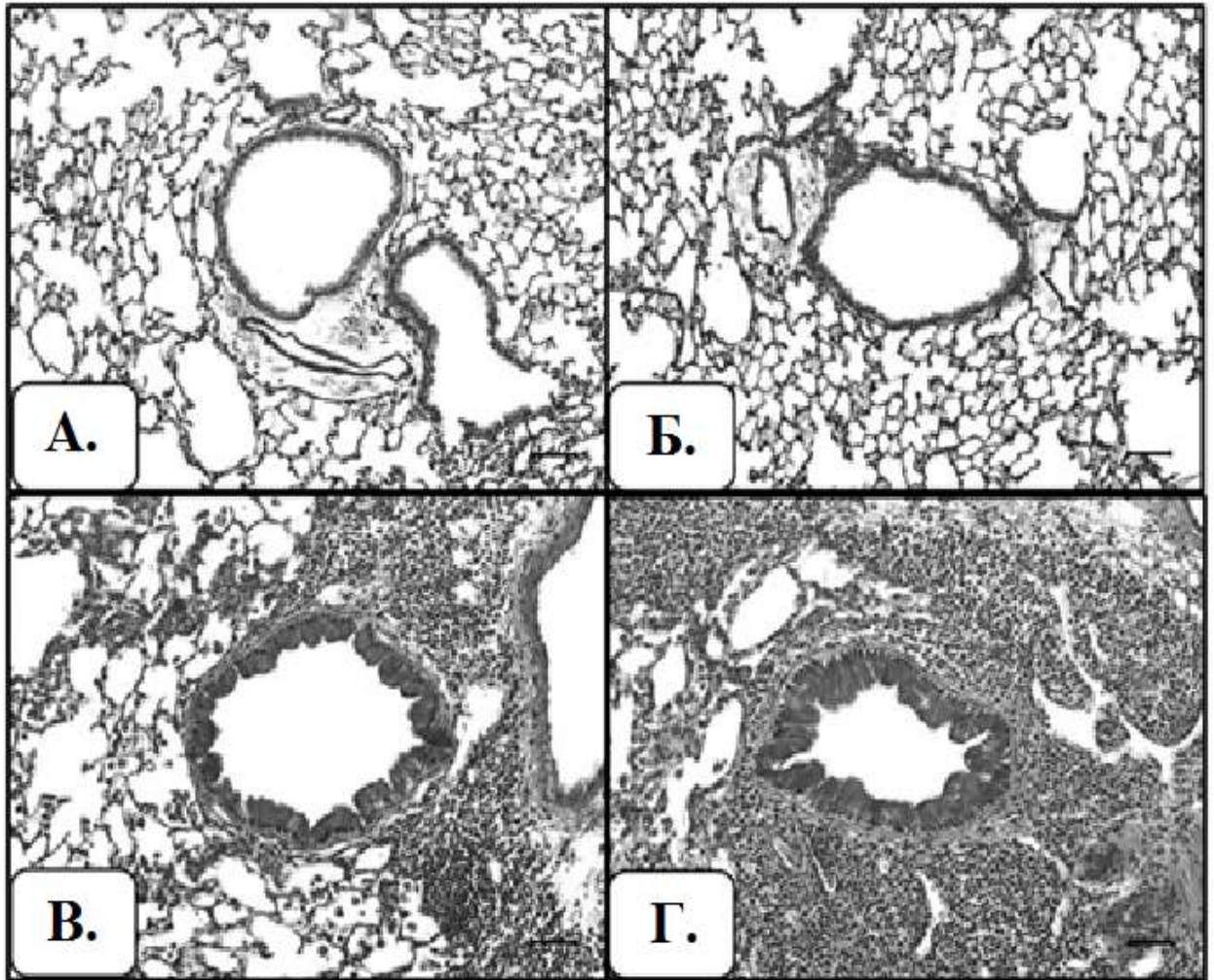


Рисунок 1. Гистологическая картина легочной ткани (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015), увеличение 200X, размер стороны изображения 50мкм:

(А) контрольная группа, нормальная гистологическая картина,

(Б) группа мышей в условиях антиортостатического вывешивания, отсутствие патологических изменений,

(В) группа мышей с АВДП в условиях нормальной опорной нагрузки, инфильтрация легочной ткани воспалительными клетками,

(Г) группа мышей с АВДП в условиях 2-недельного антиортостатического вывешивания, выраженное усиление инфильтрации легочной ткани воспалительными клетками.

3.3.6. Респираторная система грызунов

Респираторная система грызунов отличается от респираторной системы человека, что зачастую вызывает трудности в анализе данных доклинических испытаний лекарственных средств и прогнозирования их эффекта при проведении клинических испытаний (Holmes A.M., Solari R. et al., 2011). Воздух проходит через носовые ходы мыши, которые выстланы мерцательным эпителием с низкими фильтрационными свойствами, попадает в гортань, затем в трахею, за которой следует семь ответвлений бронхов, заканчивающихся альвеолярным отделом. Поскольку по сравнению с массой животного бронхиальная сеть является достаточно широкой и с невысокой резистентностью, образуется большое функциональное мертвое пространство (Крючков Н.А., Башкатова Ю.Н. и др., 2010).

В левом легком мыши, в отличие от бронхиального дерева человека, главный бронх не делится на долевые бронхи, а дает многочисленные сегментарные бронхи. В правом легком от правого главного бронха сразу же от места бифуркации отходит правый краниальный долевоый бронх, далее от главного бронха отходят правый средний, правый каудальный и правый добавочный долевоый бронхи. От каждого долевоого бронха отходит множество сегментарных бронхов, которые доставляют воздух к целому одиночному бронхо-легочному сегменту (Рис. 2). Дальнейшее деление на конечные бронхи происходит не по магистральному, а по дихотомическому типу.

Учитывая описанные анатомические особенности, требуется проявлять особое внимание к содержанию экспериментальных животных, а именно питанию, воздействию стрессорных факторов, созданию оптимальных температурных, гигиенических условий, влажности, поскольку они достаточно восприимчивы к респираторным заболеваниям. Кроме того, описанные особенности строения приводят к тому, что ингалируемые агенты (в том числе аллергены) эффективно достигают терминальных отделов респираторного тракта, что делает грызунов удобной моделью для исследования влияния различных веществ на иммунные процессы в легких, а особенно на развитие аллергических реакций.

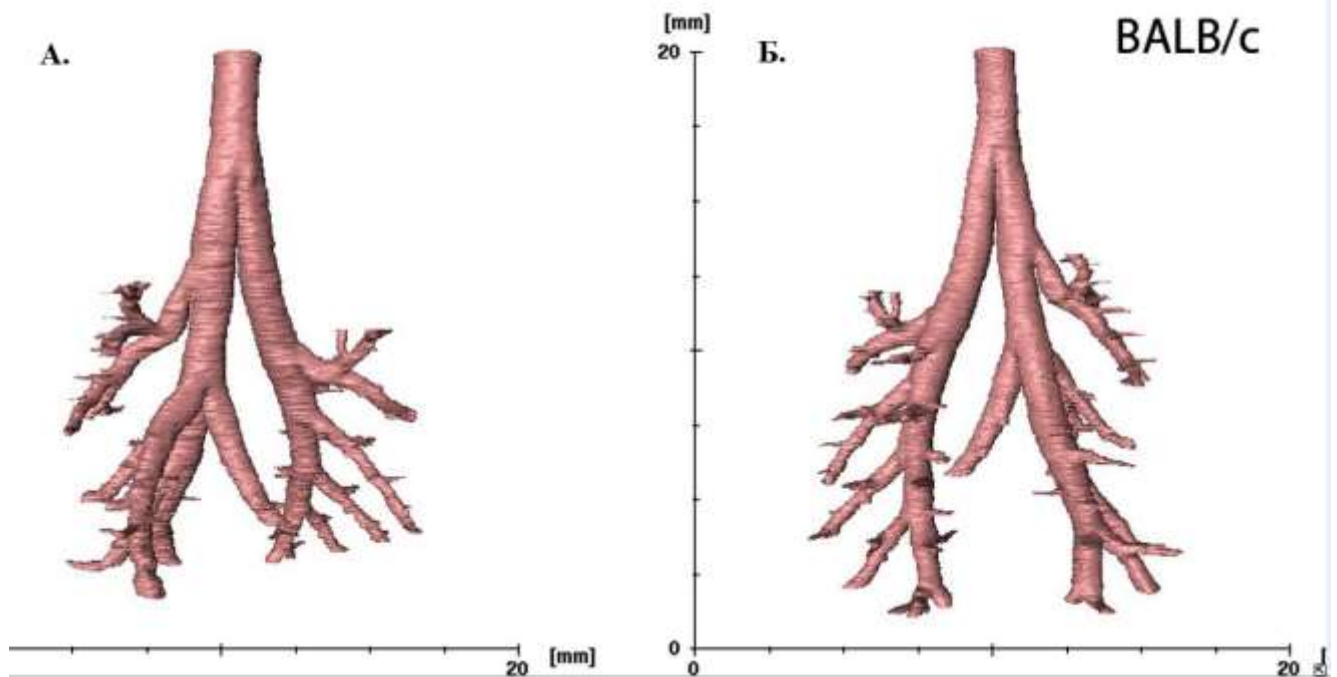


Рисунок 2. Строение бронхиального дерева мышей (линия BALB/c) в виде 3Д-модели, полученная с помощью компьютерной томографии высокого разрешения. (Thiesse J., Namati E. et al., 2010): (А) вид спереди, (Б) вид сзади.

3.3.7. Модели для исследования механизмов АВДП

Для изучения этиологии и патогенеза АВДП, фармакодинамики и фармакокинетики противоаллергических лекарственных препаратов для респираторного тракта широко используются клеточные, органные и организменные модели (Karol M.H., 1994, Elias J.A., Lee C.G. et al., 2003, Regal J.F., 2004). Основной задачей является определение ключевых цитокинов и их рецепторов, которые задают направление развития Т-клеток в сторону Th2, механизмов привлечения лейкоцитов в дыхательные пути и изучение сигнальных путей, принимающих участие в клеточной активации и секреции различных медиаторных молекул. Это позволит глубже узнать особенности патофизиологии АВДП, определить новые мишени для воздействия противоаллергических лекарственных препаратов (Shin Y.S., Takeda K. et al., 2009, Holmes A.M., Solari R. et al., 2011).

Все биологические модели основаны на введении аллергена в респираторный тракт животного и попадании его в нижние воздухоносные пути, что вызывает сенсibilизацию, в результате которой начинает развиваться иммунное воспаление.

При этом наступает ремоделирование легочной ткани и увеличение бронхоконстрикторной реактивности воздухоносных путей (Крючков Н.А., Бабахин А.А. и др., 2008). Также к специфическим признакам АДП относятся высокий уровень IgE-антител, морфологические изменения ткани легких и изменение клеточного состава бронхоальвеолярного лаважа.

Для моделирования АДП используют мышей, морских свинок, крыс, кроликов, овец, кошек, свиней, собак, приматов. Наиболее популярной является мышинная модель, обладающая рядом преимуществ (Karol M.H., 1994, Литвин Л.С., Бабахин А.А. и др., 2006, Zosky G.R. Sly P.D., 2007, Литвин Л.С., 2007, Крючков Н.А., Башкатова Ю.Н. и др., 2010). Среди достоинств мышинной модели можно отметить налаженную технологию получения чистых линий, нокаутных и трансгенных мышей, идентичность иммунных, гистологических, функциональных особенностей АДП человека и экспериментальной модели, наличие эффективных лабораторных и инструментальных методов оценки иммунологических показателей, функции внешнего дыхания, морфологических изменений у животных. Мыши могут быть сенсibilизированы к различным видам аллергенов и развивать аллерген-индуцированное воспаление в дыхательных путях. Кроме того, мыши не требуют высоких затрат на содержание, обладают коротким репродуктивным циклом, что делает их удобным объектом для изучения (Shin Y.S., Takeda K. et al., 2009, Крючков Н.А., Башкатова Ю.Н. и др., 2010, Holmes A.M., Solari R. et al., 2011).

При этом необходимо отметить, что у людей АДП чаще всего проявляется как бронхиальная астма. Она является уникальным человеческим заболеванием, которое не свойственно животным. Исключением в определенной степени являются лошади и кошки, у которых встречается такое заболевание, как эозинофильный бронхит. Тем не менее, у животных, которые, как правило, используются для изучения АДП (мыши, крысы, морские свинки, кролики), не встречается астмо-подобный синдром, аналогичный человеческому заболеванию, отсутствует спонтанная бронхиальная гиперреактивность и слабо выражена гиперплазия гладкомышечных клеток, что накладывает определенные ограничения на использование животных моделей (Holmes A.M., Solari R. et al., 2011, Kumar R.K. Foster P.S., 2012).

3.3.7.1. Используемые в модельных системах аллергены

Для индукции воспаления дыхательных путей широкое распространение получил овалбумин (ОВА) благодаря хорошо изученной структуре, налаженному коммерческому выпуску, высокой степени очистки и легкости в стандартизации дозы. Для сенсibilизации животных ОВА вводится интраперитонеально или подкожно, иногда в комбинации с неполным адьювантом Фрейнда или гидроксидом алюминия (Sakai K., Yokoyma A. et al., 1999, Литвин Л.С., Бабахин А.А. и др., 2006). Тем не менее, преимущество отдается безадьювантным методикам, поскольку они точнее имитируют патогенез заболевания, хотя применение адьюванта позволяет сместить иммунный ответ в направлении Th2-ответа и добиться увеличения уровня секреторного IgE (Conrad M.L., Yildirim A.O. et al., 2009, Durrant D.M. Metzger D.W., 2010, Крючков Н.А., Башкатова Ю.Н. и др., 2010, Holmes A.M., Solari R. et al., 2011).

Кроме ОВА для моделирования бронхиальной астмы в последнее время стали применяться пыльцевые и характерные для домашней пыли аллергены (Johnson J.R., Wiley R.E. et al., 2004, Крючков Н.А., Бабахин А.А. и др., 2008, Holmes A.M., Solari R. et al., 2011). Использование подобных аллергенов является более естественным для моделирования иммунного ответа, который возникает у человека при контакте с антигенами окружающей среды, в частности, аллергенами клещей домашней пыли или пыльцы растений. Использование этих аллергенов в моделях необходимо для разработки антиген-специфической иммунотерапии, а также для оценки ее безопасности для пациентов. В качестве аллергенов применяются как экстракты, например, экстракты домашней пыли или пыльцы растений, так и рекомбинантные единичные белки или экстрагированные сенсibilизирующие компоненты не белкового происхождения. Схемы иммунизации обычно построены на подобию моделей с использованием ОВА, предпочтение также отдается безадьювантному введению аллергенов (Крючков Н.А., Бабахин А.А. и др., 2008, Крючков Н.А., Бабахин А.А. и др., 2008). Интересные результаты были получены Хосельтоном (Hoselton) и соавт. (Hoselton S.A., Samarasinghe A.E. et al., 2010), которые показали, что несмотря на маленький размер дыхательных путей мышей (10мкм в диаметре, что в 20 раз меньше, чем у человека) при ингаляции спор грибов *Aspergillus fumigatus* они попадают в нижние дыхательные пути мышей. При этом у сенсibilизированных

животных усиливалась бронхиальная гиперреактивность, происходила структурная перестройка воздухоносных путей, которая заключалась в увеличении толщины эпителия, метаплазии бокаловидных клеток, перибронхиальном отложении коллагена. Кроме того, после ингаляции спор грибов увеличивалась масса перибронхиальных гладкомышечных волокон (Hoselton S.A., Samarasinghe A.E. et al., 2010).

Стоит отметить, что пока разработано достаточно мало моделей с использованием распространенных аэроаллергенов, среди которых успешно применяются модели с использованием пыльцы тимopheевки, экстрактов домашней пыли и др. (Johnson J.R., Wiley R.E. et al., 2004, Крючков Н.А., Бабахин А.А. и др., 2008, Shin Y.S., Takeda K. et al., 2009). Разработка моделей с использованием новых аллергенов является актуальной задачей современной иммунологии (Holmes A.M., Solari R. et al., 2011).

3.3.7.2. Методика постановки экспериментальных моделей и механизмы происходящих изменений на примере хорошо стандартизированной модели ОВА-индуцированного АВДП

Наиболее часто применяемые схемы иммунизации включают 7-8-кратное интраперитонеальное введение через день по 10-20 мкг ОВА, затем этап провокации через 7-14 дней с введением аллергена ежедневно от 2 до 8 раз или с перерывами в несколько дней ингаляционно, интраназально или интратрахеально. Необходимо отметить, что различные виды мышей по-разному реагируют на один и тот же протокол иммунизации, поэтому при проведении экспериментов с использованием мышинных моделей необходимо учитывать видоспецифические отличия (Nials A.T., Uddin S., 2008, Крючков Н.А., Башкатова Ю.Н. и др., 2010, Holmes A.M., Solari R. et al., 2011).

После определенного количества интраперитонеальных или подкожных введений происходит накопление пула клеток памяти. Таким способом формируется специфический иммунитет. Затем проводится аллергенная провокация посредством аэрозольного, интраназального или интратрахеального введения ОВА. В результате развивается эозинофильное воспаление с инфильтрацией стенок бронхов,

переключение на IgE-ответ, что после нескольких контактов с аллергеном приводит к развитию бронхиальной гиперреактивности. При ингаляционной провокации увеличивается приток эозинофилов и лейкоцитов в очаг воспаления, значительно усиливается продукция IgE-антител, более выражено ремоделирование дыхательных путей. Модели с использованием интратрахеальной аллергенной провокации удобны для изучения ранней фазы воспалительного ответа, в то время как модели с ингаляционной провокацией более удобны для изучения ремоделирования дыхательных путей и индукции эозинофилии (Samarasinghe A.E., Hoselton S.A. et al., 2011).

Разрешение воспаления дыхательных путей происходит в течение нескольких недель после заключительной ингаляции аллергена (Shin Y.S., Takeda K. et al., 2009).

3.3.7.3. Краткосрочные и долгосрочные модели

Поскольку, как уже упоминалось выше, у мышей не возникает спонтанной гиперреактивности и не развивается классическое АДП, для моделирования болезни необходимо индуцировать астма-подобные реакции в воздухоносных путях. Мышиные модели острого аллергического ответа достаточно распространены и широко применяются в различных исследованиях с использованием различных аллергенов. Результат, который будет получен при использовании той или иной модели, зависит от выбора линии мышей, вида аллергена, протокола сенсibilизации и провокации аллергеном (Nials A.T. Uddin S., 2008).

Краткосрочные (или «острые») модели подходят для изучения немедленных аллергических и псевдоаллергических реакций, а также отсроченных реакций, определения эффективности лекарственных препаратов для купирования приступа или его предотвращения, их безопасности (Sakai K., Yokoyama A. et al., 2001, Nials A.T. Uddin S., 2008). Наиболее распространены для моделей острого АДП мыши линии BALB/c, потому что у них развивается ярко выраженный Th2-клеточный ответ. Тем не менее, другие линии, такие как C57BL/6 и A/J, также успешно использовались в краткосрочных экспериментах. Краткосрочные эксперименты, как правило, требуют применения адьюванта для развития выраженного Th2-ответа. Безадьювантные протоколы тоже описаны в литературе, но они требуют большего количества

иммунизаций для достижения необходимого результата (Nials A.T. Uddin S., 2008). При постановке краткосрочных моделей происходит увеличение уровня IgE, гиперплазия бокаловидных клеток, гипертрофия эпителия, в эксперименте удобно изучать клеточно-медиаторные взаимодействия, динамику развития аллергического воспаления. При этом отсутствуют изменения, выявляемые у пациентов с хронической бронхиальной астмой, такие как ремоделирование и хроническое воспаление дыхательных путей (Nials A.T. Uddin S., 2008, Kumar R.K. Foster P.S., 2012).

Долгосрочные модели (или «хронические») более трудоемки, но благодаря ремоделированию дыхательных путей, развивающемуся при использовании этих моделей, возможно изучение эффективности препаратов, направленных на модифицирование течения астмы (Sakai K., Yokoyama A. et al., 2001, Nials A.T. Uddin S., 2008). Разработаны различные протоколы иммунизации с удлинённым периодом сенсибилизации. Для постановки таких моделей используется большее количество экспозиций, но при этом разовая доза аллергена значительно ниже, чем при индукции острого воспаления (Nials A.T. Uddin S., 2008, Shin Y.S., Takeda K. et al., 2009). При изучении возможностей постановки долгосрочных моделей исследователи столкнулись с проблемой индукции толерантности при продолжительной экспозиции овальбумина. Этот феномен вызвал повышенный интерес и усилия ученых были направлены на минимизацию паренхиматозного воспаления и развития толерантности (Kumar R.K. Foster P.S., 2012). Несмотря на то что долгосрочные модели по физиологическим показателям ближе к бронхиальной астме, наблюдаемой у человека, при использовании долгосрочных мышинных моделей ремоделирование дыхательных путей происходит в большей степени за счет фиброза, а не гипертрофии гладких мышечных волокон, как это происходит у человека (Holmes A.M., Solari R. et al., 2011, Kumar R.K. Foster P.S., 2012).

3.3.7.4. Анализ изменений, полученных в экспериментальных моделях

Для изучения изменений, происходящих в организме модельных животных, применяется широкий спектр различных методов, в который входят молекулярно-генетические, биохимические, морфологические, иммунологические и

функциональные методы (Zosky G.R. Sly P.D., 2007, Крючков Н.А., Бабахин А.А. и др., 2008). К функциональным методам относят определение функции внешнего дыхания. При развитии заболевания у человека возникает ряд функциональных сдвигов, среди которых сужение просвета и увеличение ригидности дыхательных путей, окклюзия мелких бронхов и бронхиол (Kips J.C., Anderson G.P. et al., 2003). В мышинных моделях для воспроизведения этих признаков могут применяться только хронические модели, но даже в этом случае не всегда может возникнуть спонтанная гиперреактивность. Поэтому при проведении функциональных проб нередко используют нагрузочные пробы с метахолином (Hoymann H.G., 2007, Hoselton S.A., Samarasinghe A.E. et al., 2010, Крючков Н.А., Башкатова Ю.Н. и др., 2010).

Существует несколько разновидностей функциональных проб: неинвазивные, полуинвазивные и инвазивные (Kips J.C., Anderson G.P. et al., 2003, Glaab T., Taube C. et al., 2007, Shin Y.S., Takeda K. et al., 2009). Последние наиболее точные, но сопряжены с гибелью животного, что делает невозможными повторные измерения. В этом случае проводится пункция хвостовой вены для введения бронхоконстриктора и вводится интратрахеальная канюля. Манипуляции являются достаточно трудоемкими и имеют ряд технических сложностей. Неинвазивные методики предполагают расчет определенных показателей, основанных на изменении давления воздуха в изолированной камере с помещенным внутрь экспериментальным животным. В случае полуинвазивных методов метахолин доставляется в виде аэрозоля, что устраняет необходимость в катетеризации вен (Glaab T., Taube C. et al., 2007, Hoymann H.G., 2007, Shin Y.S., Takeda K. et al., 2009, Крючков Н.А., Башкатова Ю.Н. и др., 2010).

Для получения гистологических данных производится забор легкого, его фиксация в парафине и затем получение срезов, как правило, в коронарной проекции. Затем срезы окрашиваются специфическими красителями в зависимости от целей: изучение воспалительных изменений, метаплазии бокаловидных клеток или обнаружение субэпителиальных депозитов коллагеновых волокон. Иммуногистохимическое исследование проводится с целью определения локализации гиперплазированных, гипертрофизированных мышечных волокон (Samarasinghe A.E., Hoselton S.A. et al., 2011). Соотношение эозинофилов, макрофагов/моноцитов, нейтрофилов и лимфоцитов определяется методом подсчета клеток в

бронхоальвеолярных лаважах (БАЛ) (Hoselton S.A., Samarasinghe A.E. et al., 2010). С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) проводится определение уровня цитокинов и антител (Hoselton S.A., Samarasinghe A.E. et al., 2010).

Поскольку в патогенезе АВДП принимает участие множество факторов, в том числе влияние окружающей среды, то необходимо учитывать его и при постановке экспериментальных моделей. Описан ряд экспериментов, учитывающих роль загрязнений окружающей среды, ожирения, влияние табачного дыма и вирусных инфекций. Модели имеют те же ограничения, что и все животные модели, поэтому необходимо использовать комплексный подход при изучении данного заболевания (Konga D.B., Kim Y. et al., 2009, Calixto M.C., Lintomen L. et al., 2010, Holmes A.M., Solari R. et al., 2011).

3.4. Белки теплового шока 70кДа

Белки теплового шока 70 кДа (БТШ70) – представители стресс-индуцируемых белков, экспрессирующиеся всеми живыми организмами и обладающие высокой степенью межвидовой гомологии (Mayer M.P. Bukau B., 2005). Эти белки выполняют функции шаперонов, они обладают способностью связывать поврежденные или свежесинтезированные гидрофобные участки пептидов и восстанавливать их структуру. Также эти белки участвуют в элиминации денатурированных или неправильно свернутых белков (Liu D.J., Hammer D. et al., 2014, Zeng Y., Cao R. et al., 2015).

Семейство представлено несколькими белками с молекулярной массой от 66 до 78 кДа. На основе характера синтеза и экспрессии представителей семейства БТШ70 делят на конститутивные и индуцируемые белки (Benjamin I.J. McMillan D.R., 1998, Arispe N., Doh M. et al., 2002). Представителем конститутивных БТШ70 является HspA8 (Hsc70) с молекулярной массой 73 кДа. Кроме того, выделяют органеллоспецифические изоформы этого белка: HSPA5, так называемый BiP или Grp 78, имеющий молекулярную массу 78 кДа и находящийся преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, а также митохондриальный HSPA9 или mtHsp70, имеющий молекулярную массу 75 кДа. В литературе также описан белок HSPA13, или Stch, обнаруженный в микросомах (Kampinga H.H., Hageman J. et al., 2009). В

ответ на тепловой и оксидативный стрессы, а также в некоторых других случаях, происходит индукция и последующий синтез белков HSPA1A/B, наиболее известный из которых HSPA6 обозначается в литературе как Hsp72, так как его молекулярная масса 72 кДа. Для индукции транскрипции необходимо связывание факторов теплового шока (HSF), например HSF1, с регуляторными транскрипционными элементами теплового шока (HSE) в составе промоторного участка гена БТШ70 (Pirkkala L., Nykanen P. et al., 2001).

3.4.1. Гомология и иммуногенность

Белки семейства БТШ70 считаются одними из наиболее консервативных. Например, гомология между БТШ70 из гриба *Aspergillus fumigatus* составляет от 81% до 84% с БТШ70 млекопитающих (Cerqueira G.C., Arnaud M.V. et al., 2013).

Несмотря на высокую степень гомологии, БТШ70 являются иммунодоминантными белками, о чем свидетельствует формирование высокого уровня IgG у мышей, иммунизированных БТШ70 *Mycobacterium tuberculosis*. При этом интересно отметить, что Т-клеточные эпитопы, которые в результате детального исследования были определены как индукторы пролиферативной активности Т-лимфоцитов, оказались гомологичными для БТШ70 микобактерии и мыши. Кроме того, специфический к БТШ70 микобактерии туберкулеза Т-клеточный ответ был выявлен у пациентов, не переносивших заболевания, вызываемые *Mycobacterium tuberculosis* и в отсутствии профилактической вакцинации (Borges T.J., Wieten L. et al., 2012).

3.4.2. Структурные особенности, определяющие основные функции БТШ70

Все вышеперечисленные представители семейства БТШ70 обладают АТФ-азной активностью (Menoret A., 2004, Joly A.L., Wettstein G. et al., 2010). Нуклеотид-связывающий домен (45 кДА) находится на наиболее консервативном участке молекулы белка (Рис. 3), ближе к N-концу его первичной структуры и содержит АТФ-связывающий центр, характерный для представителей суперсемейства актино-подобных белков АТФ-аз, называемого также суперсемейством

актин/БТШ70/гексокиназ (Bork P., Sander C. et al., 1992). АТФ-связывающий центр в составе БТШ70 обычно представлен лизином, пролином, тирозином, фенилаланином, аргинином и глутамином (Vogel M., Bukau B. et al., 2006). Положения аминокислот, входящих в АТФ-связывающий центр могут варьировать у белков различной природы. Например, в структуре БТШ70 мыши (HSP70 [Mus musculus], GenBank: AAC84169.1) АТФ-связывающий центр представлен лизином в положении 71, пролином – 147, тирозином – 149, фенилаланином – 150, аргинином – 155 и глутамином – 175, тогда как в представителе семейства БТШ70, выделенном из гриба *A. fumigatus* (AFUA_1G07440) (Albrecht D., Guthke R. et al., 2010) аминокислоты АТФ-связывающего центра находятся в положениях K69, P145, Y147, F148, 153 и E173, соответственно. При этом смещение позиции не приводит к изменению конформации домена (Vogel M., Bukau B. et al., 2006).

БТШ70 способны связывать АТФ с аффинностью порядка 10^{-8} М (Wang C. Lee M.R., 1993, Wei J. Hendershot L.M., 1995), что значительно превышает константу взаимодействия этого нуклеотида с другими протеинами, экспрессия которых увеличивается под действием теплового стресса, и позволяет выделить этот белок при помощи аффинной хроматографии с использованием АТФ-агарозы (Welch W.J. Feramisco J.R., 1985).

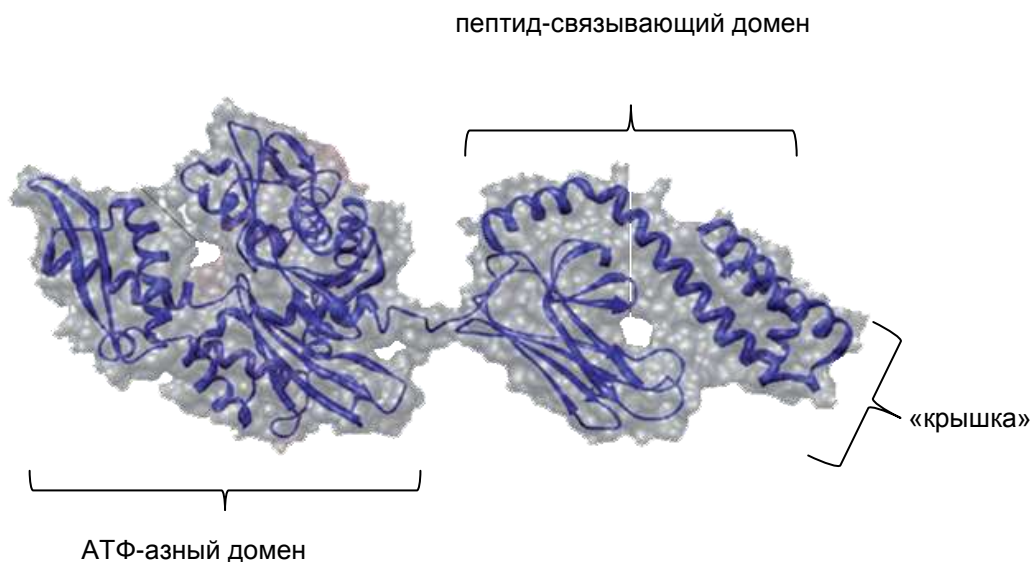


Рисунок 3. Структура БТШ70 представлена АТФ-азным доменом и пептид-связывающим доменом, соединенными гидрофобным линкерным участком. Адаптировано из статьи (Kampinga H.H., Craig E.A., 2010).

Участие БТШ70 в физиологических процессах, протекающих в живой клетке, заключается в последовательном взаимодействии БТШ70 с АТФ и далее с пептидом или денатурированным белком. Подобное взаимодействие происходит в присутствии кошаперона и вспомогательных белков и приводит к проявлению БТШ70 АТФ-азной активности и дефосфорилированию АТФ до АДФ (Kityk R., Kopp J. et al., 2012). Наиболее охарактеризованные в случае БТШ70 кошапероны – представители семейства J-белков, способствующие интенсификации дефосфорилирования АТФ, и нуклеотид-обменивающие факторы (nucleotide exchanging factors, NEFs), отвечающие за выход АДФ из комплекса с БТШ70, имеют сайты связывания также в пределах нуклеотид-связывающего домена (Rampelt H., Mayer M.P. et al., 2011).

Различие сродства АТФ- и АДФ-содержащих форм БТШ70 к белкам-мишеням служит основой функционирования этих шаперонов (Wei J., Hendershot L.M., 1995, Mel'nikov E.E., Rotanova T.V., 2010). Кроме того, как константа связывания АТФ, так и скорость дефосфорилирования зависят от pH среды, присутствия двухвалентных ионов и температуры (Welch W.J., Feramisco J.R., 1985, Palleros D.R., Welch W.J., et al., 1991).

Функциональная активность шаперонов БТШ70 заключается в их способности распознавать денатурированные протеины, экспонирующие гидрофобные участки поверхности, с которыми взаимодействует субстрат-связывающий сайт БТШ70 (Palleros D.R., Welch W.J. et al., 1991, Joly A.L., Wettstein G. et al., 2010). Последний расположен на наиболее вариабельном С-концевом домене этого протеина и представлен 15кДа β-складчатым участком, содержащим гидрофобную бороздку и 10кДа α-спиральной «крышкой» (Mel'nikov E.E., Rotanova T.V., 2010, Assimon V.A., Gillies A.T. et al., 2013). Таким образом, субстрат-связывающий участок БТШ70 способен взаимодействовать с гидрофобными регионами, характерными для вновь образующихся или поврежденных белков. Отсутствие выраженной специфичности позволяет молекулам БТШ70 распознавать широкий спектр белков и пептидов (Schlecht R., Erbse A.H. et al., 2011).

Поскольку субстрат-связывающий сайт БТШ70 располагается на С-конце аминокислотной последовательности белка – участке молекулы, характеризующемся низкой степенью гомологии и видо-специфичностью, то взаимодействующий с этим

сайтом субстрат может различаться для БТШ70, полученных из разных источников. В частности, такие различия были зарегистрированы при сравнении интенсивности связывания бактериального DnaK, бычьих GRP78 и индуцируемой и конститутивной форм БТШ70 с S-пептидом из состава рибонуклеазы А (Terlecky S.R., Chiang H.L. et al., 1992). Достоверные различия в пептид-связывающей специфичности для представителей семейства БТШ70 различной природы – бактериального DnaK и человеческих Hsc70 и BiP, были также продемонстрированы Gragerov и Gottesman (Gragerov A., Gottesman M.E., 1994) в работах с использованием в качестве субстрата панели синтетических гептапептидов.

Наибольший интерес со стороны иммунологов к шаперонной активности БТШ70 связан со способностью представителей этого семейства протеинов взаимодействовать с молекулами главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) как первого, так и второго класса МНС I и МНС II и участвовать в процессинге и презентации антигена. Молекулы внутриклеточного пула БТШ70 соединяются с пептидами, образующимися внутри клетки, и способствуют представлению их в составе МНС I, что впоследствии запускает активацию цитотоксических лимфоцитов. В то же время молекулы БТШ70, высвобождающиеся из клетки, принимают участие в процессинге и презентации пептида в составе МНС II соседних антиген-представляющих клеток, способствуя активации Т-хелперного иммунного ответа (Srivastava P., 2002). Rohrer et al. (Rohrer K.M., Haug M. et al., 2014) провели анализ связывания пептида и молекулы человеческого лимфоцитарного антигена-DR (human leukocyte antigen, HLA-DR) с человеческим цитозольным белком Hsc70, с его процессированными формами, лишенными либо нуклеотид-связывающего, либо субстрат-связывающего домена, а также с белком, содержащим единичные аминокислотные замены в пептид-связывающей бороздке. Оказалось, что за связывание с МНС II отвечает субстрат-связывающий домен БТШ70, при этом в результате взаимодействия МНСII и БТШ70 не происходит конформационных изменений в пептид-связывающей бороздке. Таким образом, БТШ70 принимает непосредственное участие в презентации антигена, но при этом не оказывает влияния на взаимодействие МНСII-пептид.

3.4.3. Особенности внеклеточного пула БТШ70

Большая часть белков, являющихся представителями семейства БТШ70, синтезируются в цитозоле. В их структуре отсутствует сигнальная последовательность, обеспечивающая транспорт этих протеинов в эндоплазматический ретикулум, который необходим для реализации классического аппарата Гольджи-зависимого механизма секреции белков (Mambula S.S., Stevenson M.A. et al., 2007, De Maio A., 2011). При этом поверхностная экспрессия БТШ70 наблюдается не только при повреждении цитоплазматической мембраны или в процессе гибели клетки, сопровождающейся разрывами клеточных мембран, но и на поверхности живых трансформированных клеток: опухолевых или вирус-инфицированных (Basu S., Binder R.J. et al., 2000, Multhoff G., 2007). В настоящее время определено несколько потенциальных механизмов секреции БТШ70 в ответ на различные стимулы (Wheeler D.S., Chase M.A. et al., 2009, De Maio A., 2011, Зяблицин А.В., Алекперов Э.А. и др., 2012). Кратко эти пути можно обозначить как лизосомально-эндосомальный, экзосомальный – за счет связывания с АТФ, и активная транспортировка при связывании с белком, имеющим сигнальную последовательность (Mambula S.S., Stevenson M.A. et al., 2007, Prado N., Marazuela E.G. et al., 2008, Joly A.L., Wettstein G. et al., 2010).

Повышение секреции БТШ70 во внеклеточное пространство служит «сигналом опасности», при этом БТШ70, по-видимому, не является активатором воспалительного процесса, а секретируется с целью предотвратить деградацию каких-то белковых структур и препятствовать развитию воспаления (Njemini R., Lambert M. et al., 2003, Pockley A.G., Fairburn B. et al., 2007, Wheeler D.S., Chase M.A. et al., 2009, De Maio A., 2011, Stocki P. Dickinson A.M., 2012).

3.4.4. Роль БТШ70 в АДП

При развитии АДП протеины семейства БТШ70 могут проявлять как провоспалительную, так и противовоспалительную активность. Одним из факторов, определяющих характер воздействия БТШ70, является природа этого белка.

3.4.4.1. Проаллергический потенциал БТШ70

Согласно базе данных молекул аллергенов AllFam многие белки, относящиеся к семейству БТШ70, являются аллергенами (Radauer C., Vublin M. et al., 2008). Большинство этих белков охарактеризовано как аэроаллергены, за исключением белка Mala s 10 (Andersson A., Rasool O. et al., 2004), отнесенного к контактными аллергенами. Среди белков БТШ70 к аллергенам также относятся: Der f HSP70 (Aki T., Fujikawa A. et al., 1994), Alta 3 (Breitenbach M., Simon-Nobbe B., 2002), Cla h 4 (Zhang L., Muradia G. et al., 1996, Breitenbach M., Simon-Nobbe B., 2002), Cor a 10 (Gruehn S., Suphioglu C. et al., 2003), Pen c 19 (Shen H.D., Au L.C. et al., 1997) и некоторые другие (Chuang J.G., Su S.N. et al., 2010, Singh B., Sharma G.L. et al., 2011). Также по данным библиотеки аллергенов AllFam, ни один из белков, относящихся к семейству БТШ70, не является аутоаллергеном. При этом корреляция между повышением уровня IgG1 к собственному белку БТШ70 и степенью тяжести АДП наблюдалась у пациентов-астматиков (Yang M., Wu T. et al., 2005). Дальнейшие исследования выявили ассоциацию между повышением сывороточного уровня БТШ70 и повышением уровня нейтрофилов в дыхательных путях, в то время как уровень БТШ70 в мокроте коррелировал с уровнем лимфоцитов (Cramer R., 2012). Кросс-реактивность антител сыворотки к собственному белку БТШ70 также была показана для пациентов с atopической экземой или дерматитом, с гиперчувствительностью к белку Mala s 10 (Andersson A., Rasool O. et al., 2004). Таким образом, несмотря на низкую иммуногенность, вследствие высокой степени гомологии, белки семейства БТШ70, синтезируемые в организме человека, в определенных обстоятельствах могут усиливать симптомы аллергического воспаления.

3.4.4.2. Супрессорный потенциал БТШ70 при АДП

Shin et al. (Shin Y.S., Takeda K. et al., 2009) описали способность рекомбинантного Hsp65 *Mycobacteria leprae* ослаблять гиперчувствительность дыхательных путей. Было обнаружено, что индуцированное усиление экспрессии БТШ70 способно защищать легочные ткани от развития фиброза различной этиологии (Fujibayashi T., Hashimoto N. et al., 2009, Tanaka K., Tanaka Y. et al., 2010).

Кроме того, увеличенная экспрессия БТШ70 наблюдалась при изучении механизмов супрессорного воздействия нестероидных противовоспалительных препаратов на секреторную активность тучных клеток, играющих важную роль в аллергических реакциях (Mortaz E., Engels F. et al., 2009). Кроме того, увеличенную концентрацию БТШ70 обнаружили в составе экзосом, которые были выделены из бронхоальвеолярных смывов у мышей с индуцированной толерантностью к аллергену (Prado N., Marazuela E.G. et al., 2008). Более того, было показано, что привентивная интраназальная иммунизация мышей такими экзосомами препятствовала развитию АДП, развивавшегося при сенсibilизации и последующей ингаляцией аллергена пыльцы оливкового дерева (Prado N., Marazuela E.G. et al., 2008).

3.4.4.3. Предполагаемые механизмы противовоспалительного эффекта БТШ70

Существует несколько предполагаемых механизмов взаимодействия БТШ70 с клетками иммунной системы, которые могут обуславливать противовоспалительный эффект БТШ70, в том числе при АДП. Исследования затруднены тем, что к настоящему времени у клеток иммунной системы не обнаружено рецепторов, селективно распознающих внеклеточную форму БТШ70. В то же время охарактеризован целый ряд рецепторных структур, например, комплекс TLR2/TLR4 и CD14, а также рецепторы CD91 и LOX-1, способных взаимодействовать с молекулами БТШ70. Большинство этих рецепторов экспрессируются клетками системы врожденного иммунитета, представителями которых являются антиген-представляющие клетки (АПК). В настоящее время хорошо известно, что АПК играют важную роль в развитии аллергических заболеваний дыхательных путей. Используя лектиновые рецепторы, АПК распознают, интернализуют, процессируют и представляют на своей поверхности в составе молекул главного комплекса гистосовместимости, МНС-II, большинство аллергенов. В условиях атопического статуса организма формирующийся адаптивный иммунный ответ, опосредованный Th2, характеризуется синтезом IgE и накоплением клеток иммунологической памяти, ответственных за развитие гипериммунных реакций (Lambrecht V.N., 2005). Поэтому очевидно, что для изучения роли внеклеточного пула БТШ70 в процессах аллергического воспаления представляет интерес анализ эффектов и механизмов

взаимодействия этих протеинов с антиген-представляющим звеном иммунной системы.

Stocki et al. (Stocki P., Morris N.J. et al., 2010). продемонстрировали, что инкубация незрелых ДК, полученных из человеческих моноцитов, с очищенным от эндотоксина БТШ70 приводила к снижению способности этих клеток стимулировать Т-лимфоциты. В подтверждение такого иммуносупрессирующего эффекта внеклеточных БТШ70 могут служить и данные, полученные ранее. Motta et al. (Motta A., Schmitz C. et al., 2007) показали, что в отсутствие эндотоксина в препаратах рекомбинантного БТШ70 микобактерии туберкулеза препятствует созреванию ДК из предшественников костного мозга, способствуя, как и в случае человеческого БТШ70 (Stocki P. Dickinson A.M., 2012), формированию толерогенного фенотипа ДК.

Приведенные выше данные указывают на то, что один из механизмов зарегистрированных противовоспалительных эффектов внеклеточных БТШ70, в том числе, в модели АДП, может быть связан со способностью этих протеинов оказывать ингибирующее действие на антигенпредставляющую активность клеток иммунной системы. Молекулярные механизмы указанного ингибирующего эффекта могут быть связаны с активным взаимодействием БТШ70, интернализованных антигенпредставляющими клетками, с молекулами МНС-II (Rohrer K.M., Naug M. et al., 2014). Действительно, такое взаимодействие может «отключать» существенную часть внутриклеточного пула антигенпредставляющих молекул от процессинга аллергена, и снижать тем самым уровень активации Th2, регулирующих продукцию IgE – основных молекулярных индукторов процессов аллергического воспаления.

Исследования последних лет показали, что АТФ, выходящий во внеклеточное пространство при механическом повреждении, стрессе или гибели клеток, играет важную роль при АДП (Willart M.A., Lambrecht B.N., 2009). Резкое увеличение уровня АТФ в лаважной жидкости после провокации аллергеном наблюдали у пациентов-астматиков и в мышинных моделях астмы (Idzko M., Hammad H. et al., 2007). Было установлено, что при повышении уровня внеклеточного АТФ (1-100 мМ), происходит активация P2X7 рецепторов, которая вызывает рост продукции провоспалительных цитокинов IL-1, 6, 18, TNF- α макрофагами, IL-1 β , IL-18, TNF- α и IL-23 ДК, IL-8 и эозинофильного катионного белка (ЕСР) эозинофилами, гистамина тучными клетками, а указанные процессы способствуют развитию Th2-

опосредованного иммунного ответа (Gorini S., Gatta L. et al., 2013). При направленной нейтрализации АТФ в дыхательных путях в мышинной модели астмы приток воспалительных клеток и повреждение ткани бронхов значительно снижались (Idzko M., Hammad H. et al., 2007).

В нормальных физиологических условиях уровень АТФ во внеклеточном пространстве поддерживается на наномолярном уровне с помощью экзоферментов – эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазами (E-NTPD), относящихся, как и БТШ70, к суперсемейству актин/БТШ70/гексокиназ и характеризующихся сходной с БТШ70 конформацией АТФ-связывающего центра, регулируемой двухвалентными ионами Ca^{2+} или Mg^{2+} (Zimmermann H., Zebisch M. et al., 2012). Как и БТШ70, E-NTPD обладают АТФ-азными свойствами, однако эти молекулы функционируют только на поверхности клеток, но не во внеклеточном пространстве (Yegutkin G.G., 2008, Vitiello L., Gorini S. et al., 2012). Участие БТШ70 в регуляции концентрации внеклеточного пула АТФ напрямую подтверждено не было. Несмотря на это, учитывая АТФ-азную активность, можно предположить, что белки семейства БТШ70 также принимают участие в регуляции уровня АТФ во внеклеточном пространстве, лимитируя активацию P2X7 рецепторов путем снижения уровня активационного сигнала.

Как упоминалось ранее, активация Th2 звена адаптивного иммунного ответа обусловлена представлением пептидов аллергена на поверхности АПК (Lambrecht V.N., 2005, Lommatzsch M., Julius P. et al., 2006, Idzko M., Hammad H. et al., 2007). Прямое взаимодействие БТШ70 с МНСII не приводит к модификации антигенного пептида. И хотя такое взаимодействие вызывает интенсификацию презентации антигена, оно не изменяет специфичность иммунного ответа и, таким образом, не может полностью объяснить иммуномодуляторные свойства БТШ70 (Udono H. Srivastava P.K., 1993, Rohrer K.M., Haug M. et al., 2014).

Как и в случае экзогенного антигена/аллергена, связывание БТШ70 лектиновыми рецепторами на поверхности АПК приводит к интернализации белка и презентации пептидов внеклеточного БТШ70 (Borges T.J., Wieten L. et al., 2012). Stocki et al. (Stocki P., Morris N.J. et al., 2010) определили четыре эпитопа в составе белка HSPA, являющихся предшественниками ранее описанных потенциальных эпитопов для молекул HLA класс I и класс II. Следовательно повышение

концентрации внеклеточного БТШ70 не только способствует увеличению антиген-презентации пептидов БТШ70, но и влияет на специфичность антиген-презентации и Т-клеточного ответа. Подобная последовательность событий дает наиболее простое объяснение иммуномодулирующего действия БТШ70 на развитие адаптивного ответа. Показано, что пептиды белков семейства БТШ70 экспрессируются молекулами МНС как первого, так и второго класса (Stocki P., Morris N.J. et al., 2010). При этом в составе молекулы МНС II могут быть представлены как пептиды белков внеклеточного пула БТШ70, так и, в результате кросс-презентации или аутофагии, эндогенные БТШ70 (Borges T.J., Wieten L. et al., 2012).

При более детальном рассмотрении оказалось, что презентация и кросс-презентация пептидов БТШ70 приводит не к активации, а к подавлению иммунного ответа. Было показано, что БТШ70 обладает способностью ингибировать пролиферацию Т-лимфоцитов, как опосредованно – путем снижения стимуляторной активности ДК, о чем было сказано выше, так и при непосредственном воздействии на предварительно активированные Т-клетки (Borges T.J., Wieten L. et al., 2012, Brenu E.W., Staines D.R. et al., 2013). Stocki et al. провели исследование пролиферативного ответа Т-лимфоцитов под действием выращенных из моноцитарных предшественников ДК. Оценку пролиферации проводили с использованием как общего пула активированных $CD3^+CD25^+$ Т-клеток, так и не активированных $CD3^+CD25^-$ лимфоцитов, в частности Т-хелперов $CD4^+CD25^-$ и Т-киллеров $CD8^+CD25^-$. Было показано, что предварительная обработка ДК очищенным от эндотоксина рекомбинантным человеческим БТШ70 приводила к снижению пролиферации во всех исследуемых популяциях Т-клеток. Более того, в присутствии БТШ70 значительно снижалась пролиферационная и секреторная активность Т-лимфоцитов, предварительно неспецифически активированных воздействием ИЛ-2 или фитогемаглютинаина (Stocki P., Dickinson A.M., 2012).

Помимо общего супрессорного эффекта в исследованиях влияния БТШ70 на патогенез аутоиммунных заболеваний была обнаружена способность БТШ70 увеличивать численность регуляторных Т-клеток. Так, было отмечено, что инъекции БТШ70 мышам с индуцированными аутоиммунными заболеваниями усиливали системную и локальную экспрессию *Foxp3* и увеличивали процент $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в лимфатических узлах (Wieten L., van der Zee R. et al., 2010, Brenu E.W., Staines D.R.

et al., 2013). Предположительно, БТШ70 способствует дифференцировке незрелых Т-лимфоцитов по пути $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ индуцированных регуляторных Т-клеток, что соответственно ингибирует дифференцировку клеток по Th1 или Th2 пути, а также подавляет пролиферацию конвенционных популяций Т-клеток (Mantel P.Y., Kuipers H. et al., 2007, Borges T.J., Wieten L. et al., 2012).

Таким образом, на основе имеющейся информации можно рассматривать БТШ70 как перспективную основу для создания универсальных противоаллергических вакцин, поскольку белок достаточно хорошо охарактеризован, обладает высокой гомологией, АТФ-азной, шаперонной и противовоспалительной активностью. Дальнейший поиск способов регуляции как уровня продукции и секреции БТШ70 в различных тканях, так и размеров общего циркулирующего в организме сывороточного пула БТШ70 необходим для успешной терапии многих воспалительных заболеваний, в том числе и АДП.

Для разработки способов практического применения белков семейства БТШ70 или пептидов этих белков необходимо изучение их аллергенных и иммуногенных свойств, поскольку при длительном применении возможно возникновение побочных реакций и необходимо разработать препарат с их минимальным количеством, подходящий для использования в длительных КП. Кроме того, недостаточно изучены механизмы его действия на различные звенья иммунных процессов, что требует дальнейшего исследования, в особенности применительно к условиям КП, поскольку при воздействии ряда неблагоприятных факторов КП происходит модификация различных звеньев как врожденного, так и адаптивного звеньев иммунного ответа.

Мышиная модель является наилучшей для изучения перечисленных задач как в условиях нормальной нагрузки, так и при анализе воздействия факторов, моделирующих КП. Использование данной модели дает возможность провести необходимые исследования для решения поставленных задач.

4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.1. Животные

В данной работе были использованы самки мышей линии BALB/c, полученные посредством инбредного скрещивания в питомнике лабораторных животных «Пушино» (г. Пушино, Московская область, Россия) и питомнике Российской Академии Медицинских Наук (пос. Андреевка, Московская область, Россия). Мышей использовали в возрасте 10-12 недель, весом 18-20 г. Их содержали при температуре 22°C и световом цикле, составляющем 12 часов, животные не испытывали недостатка в воде и корме.

Все протоколы экспериментов и процедуры с животными были одобрены комиссией по контролю за содержанием и использованием животных Института Биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН № 179/2015 от 21.07.2015 и Государственного научного центра Российской Федерации Института Медико-биологических проблем РАН № 497 от 03.07.2018.

4.2. Выделение БТШ70 из печени и почек мышей

4.2.1. Получение гомогенатов внутренних органов животных

После эвтаназии производился забор печени и почек мышей. Полученные внутренние органы гомогенизировали с использованием лабораторных пинцетов и ножниц и затем пропускали через сито 100 мкм (SPL Life Sciences, Корея). Гомогенную массу растворяли в лизис-буфере и измельчали на первом этапе гомогенатором Ultra-Turrax (IKA, Германия), затем с использованием ультразвукового диспергатора УЗДН-А под воздействием ультразвука (УКРРОСПРИБОР, Украина). Осуществляли визуальный контроль за степенью разрушения биомассы при помощи микроскопа Axiovert 40 (Zeiss, Германия). Гомогенат подвергали центрифугированию в течение 30 минут при 3200 об/мин с использованием центрифуги SORVALL (Thermo Scientific, США); полученный супернатант собирали и центрифугировали 45 минут при 10000g с использованием

центрифуги J-21 (Beckmann, США) с последующей фильтрацией через фильтр 0,22 мкм (Millipore, Германия).

4.2.2. Выделение БТШ70 методом аффинной хроматографии

Выделение проводили на АТФ-агарозе (Sigma, США). АТФ-агарозу предварительно вымачивали в 10-кратном объеме Tris-буфера (TBS) (20 – 25 mM Tris-HCl (Хеликон, Россия) pH 7,5; 1 mM – MgCl₂ (MERCK, Германия)) в течение 3 часов. Далее колонку с АТФ-агарозой поочередно промывали 1 M раствором NaCl, 5 mM раствором АДФ в Tris-буфере и собственно Tris-буфером.

Супернатант гомогената печени и почек мышей, после фильтрации через 0,22 мкм разводили Tris-буфером с добавлением 0,1% Тритон X-100 (T-TBS) и дважды пропускали белковый раствор через колонку. С целью увеличения эффективности связывания, колонку с белковым раствором инкубировали минут при комнатной температуре в течение 20-40, и далее собирали фракцию несвязавшегося материала. Затем колонку последовательно промывали двумя объемами T-TBS, четырьмя объемами TBS и двумя объемами 0,5 M NaCl в TBS. Избыток соли удаляли 1 объемом TBS. Элюцию белок-пептидных комплексов проводили 3 mM АТФ в TBS (2-5 объемов колонки). Концентрацию элюата проводили с использованием лиофильной сушки SpeedVac Concentrator (SAVANT, США).

4.2.3. Очищение от избытка АТФ диализом в бикарбонатном буфере

Избыток АТФ из препарата БТШ70 удаляли диализом: очищенный БТШ70, полученный высокоаффинной хроматографией, диализовали против ЭДТА-бикарбонатного буфера (4,4 мг ЭДТА на 1 л дистиллированной воды; далее титровали NaHCO₃ до pH 7,4). Раствор белка был помещен в диализный мешок (Spektra/Por Membranes, Germany) с диаметром пор 25-30 нм на ночь при постоянном перемешивании и температуре +4 °С. Полученный белок был разликвочен. Белок хранили при -20 °С до момента использования.

4.2.4. Определение концентрации белка

Для определения концентрации белка использовали Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Бычий сывороточный альбумин (БСА, Sigma, США) использовали для построения калибровочной кривой. Выбор был обусловлен тем, что БСА имеет молекулярную массу 70 кДа, как и БТШ70, концентрацию которого определяли.

4.2.5. Анализ полученного препарата БТШ70 методом электрофоретического разделения

Оценку чистоты препарата белка БТШ70, полученного из гомогената печени и почек мышей, проводили при помощи электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Образцы растворяли в буфере для образцов (0,125 М Tris-HCl (Ferak, Германия), 4% додецилсульфат натрия (MERCK, Германия), 0,025% меркаптоэтанол (Sigma, США) и 0,02% бромфеноловый синий, pH 6.8 (Sigma, США)) в соотношении 1:1, затем проводили кипячение в течение 5 минут.

Для определения молекулярной массы исследуемого белка в качестве контроля используют смесь белковых маркеров (Хеликон, Россия): фосфоорилаза, 97 кДа; БСА, 66,2 кДа; овальбумин, 45 кДа; ангидраза, 31 кДа; ингибитор трипсина, 21,5 кДа; лизоцим, 14,4 кДа.

При выполнении электрофореза использовали рамку MV-1 для вертикального электрофореза (Хеликон, Россия). Разделение проводили в 10% геле, ниже приведены используемые растворы:

Буфер 30% акриламид/0,8% бисакриламид (AA/бисAA); раствор 4x TrisCl/SDS, pH 8,8 (1,5 М TrisCl : 0,4% SDS); раствор 4x TrisCl/SDS, pH 6,8 (0,5 М TrisCl : 0,4% SDS); концентрирующий 4% гель; разделяющий гель 10%.

Визуализацию проводили при помощи PageBlue Protein Staining Solution (Thermo scientific, США).

4.2.6. Идентификация БТШ70 методом иммуноблоттинга

Для того, чтобы определить гомогенность полученного препарата БТШ70, проводили иммуноблоттинг с использованием антител BRM220 (Sigma, США), специфически распознающих БТШ70.

После электрофореза часть геля погружали в буфер для переноса и выдерживали 10 минут при слабом покачивании на шейкере SHAKER S3.02. (ELMI, Латвия). Перенос белков осуществляли полусухим методом на установке Trans-blot Semi-Dry Transfer cell (Bio-Rad, UK). При этом белки из геля попадали на нитроцеллюлозную мембрану (Schleicher und Schuler, Германия). Время переноса составляло до 30 минут. При необходимости проводили контроль за переносом при помощи красителя PonsoS (Sigma, США).

Нитроцеллюлозную мембрану после переноса на нее белков инкубировали час в TBS при +4°C в присутствии антител BRM22 (титр:1:500). Затем мембрану погружали еще на час в раствор вторых антител к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Amersham, Великобритания, титр 1:5000). Инкубацию проводили при +4°C. После каждой инкубации мембрану отмывали TBS в течение 30 минут.

Визуализировали при помощи субстрата тетраметиленбензидина TMB (Promega, США).

По результатам электрофореза и иммуноблоттинга определили, что полученный препарат белка был гомогенен, обладал массой 70 кДА (Рис. 4 А) и связывал антитела BRM220, а значит является БТШ70 (Рис. 4 Б).

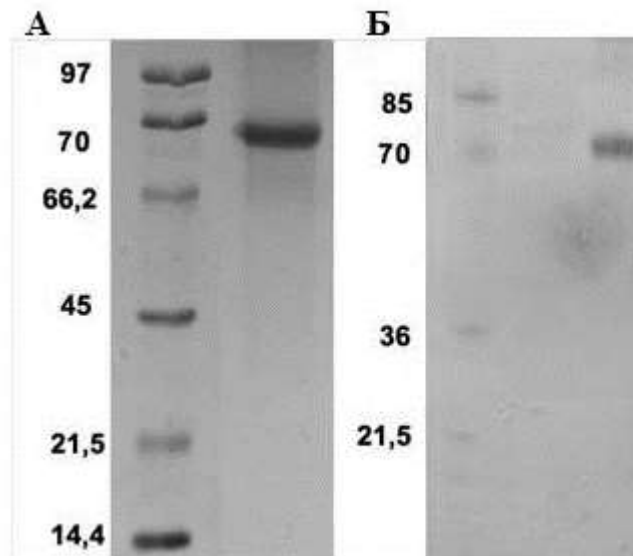


Рисунок 4. Определение БТШ70 при помощи (А) электрофоретического разделения в ПААГ с последующим (Б) иммуноблоттингом. Слева от фотографий представлены молекулярные массы применяемых маркерных белков.

Так как окончательная очистка БТШ70 была проведена на АТФ-агарозной колонке и АТФ связывался с АТФ-связывающим сайтом БТШ70, проводили диализ (как описано выше в подглаве 4.2.3). Очистка препаратов БТШ70 от АТФ необходима для сохранения АТФ-азной активности белка. Более того, примеси АТФ, может активировать провоспалительный ответ. При необходимости диализ проводили в несколько этапов, после каждого из которых, проводили анализ на наличие АТФ. Было показано, что первая ступень очистки диализом приводила к снижению примеси АТФ до 1%, а двух этапов было достаточно, для полной очистки БТШ70.

4.2.7. Определение наличия примеси LPS

Основным преимуществом использования белка, полученного из внутренних органов мышей является незначительная по сравнению с рекомбинантным белком контаминация липополисахаридом (LPS). Известно, что LPS обладает провоспалительным эффектом и способен исказить эффект белкового препарата.

Содержание примесей LPS в растворах белков, используемых в работе, оценивали методом последовательных разведений при помощи набора E-TOXATE

(Sigma, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученный препарат БТШ70, выделенный из печени и почек мышей, был охарактеризован как содержащий незначительное количество LPS (LPS_{10}).

4.3. Модель АДП

Настоящее исследование было проведено с использованием стандартных моделей индуцированного АДП, основанных на системной сенсibilизации и локальной провокации иммунного ответа.

4.3.1. Длительная модель овалбумин-индуцированного воспаления дыхательных путей

Мыши были сенсibilизированы путем внутрибрюшинного введения белка овалбумина (ОВА, Grade V, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкг/мышь, адсорбированного на носителе Imject Alum (Thermo scientific, США) на 0, 14, 21 день эксперимента. После этого, на 27, 28 день мыши получали интрафарингеальные ингаляции 0,1% раствора ОВА в ФБ (Хеликон, Россия), в количестве 50 мкл/мышь. Перед каждым интрафарингеальным введением мышей усыпляли на короткий срок при помощи изофлюрана (2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane, Sigma-Aldrich, США). Процедуру эвтаназии животных осуществляли методом дислокации шейных позвонков на 29 день эксперимента.

4.3.2. Краткосрочная модель овалбумин-индуцированного воспаления дыхательных путей

Мыши были сенсibilизированы путем внутрибрюшинного введения белка ОВА в концентрации 10 мкг/мышь, адсорбированного на носителе Imject Alum на 0 и 7 день. После этого, на 19, 20 и 21 день получали интрафарингеальные ингаляции 0,1% раствора ОВА в ФБ, в количестве 50 мкл/мышь. Перед каждым интрафарингеальным введением мышей усыпляли на короткий срок при помощи

изофлюорана. Процедуру эвтаназии животных осуществляли методом дислокации шейных позвонков на 23 день эксперимента.

Для сравнения показателей АВДП при использовании аллергена различной степени очистки (OVA grade V и LPS free OVA) использовали краткосрочную модель АВДП, описанную выше.

4.3.3. БТШ70-индуцированное воспаление дыхательных путей в краткосрочной модели АВДП

Мыши получали две внутрибрюшинные инъекции белка БТШ70, адсорбированного на носителе Imject Alum в день 0 и на 7 день. Белок БТШ70 был выделен из внутренних органов (печени и почек) сингенных мышей, и применялся в концентрации 10 мкг/мышь. Для перевода воспалительного процесса в дыхательные пути 0,1% раствор БТШ70 в ФБ вводили интрафарингеально в количестве 50 мкл/мышь на 19, 20 и 21 день от начала эксперимента. Перед каждым интрафарингеальным введением мышей усыпляли на короткий срок при помощи изофлюорана. Эвтаназию проводили методом дислокации шейных позвонков на 23 день эксперимента.

4.3.4. Индукция гуморального иммунного ответа на аутологичный БТШ70 при экзогенном введении

Выделенный из внутренних органов мышей белок БТШ70 вводили мышам той же линии путем внутрибрюшинных инъекций ежедневно (5 раз в неделю) в количестве 10 мкг/мышь/инъекцию в течение 7 недель.

4.3.5. Введение БТШ70 в дыхательные пути мышей

Мышам с ОВА-индуцированным АВДП через 24 часа после последней ингаляции аллергена интрафарингеально вводили 50 мкл белка БТШ70, разведенного фосфатным буфером до концентрации 20 мкг/мл.

4.4. Антиортостатическое вывешивание

С целью моделирования условий опорной разгрузки у грызунов проводилось антиортостатическое вывешивание их задних конечностей 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. Животные опирались на передние конечности и могли с их помощью свободно перемещаться по клетке. Задние конечности не касались дна клетки. Вывешивание осуществлялось за основание хвоста так, чтобы угол составлял 30-40 градусов. Животные имели постоянный доступ к пище и воде.

Вывешивание проводилось следующим группам животных:

- контрольная группа мышей в условиях опорной разгрузки,
- мыши с АВДП в условиях опорной разгрузки,
- мыши с АВДП и последующим введением БТШ70 в условиях опорной разгрузки,
- мыши с АВДП и последующим введением денатурированного БТШ70 в условиях опорной разгрузки.

4.5. Определение клеточного состава и общего количества клеток бронхоальвеолярного лаважа

Мыши подвергались эфтаназии при помощи цервикальной дислокации. Затем мышам в трахею вводили канюлю, с помощью которой в легкие вводили ФБ. Объемы введенного ФБ составляли по 0,8 мл каждый. Объемы отбираемой клеточной суспензии: 0,5 мл и 0,8 мл. Суспензию клеток БАЛ помещали в эппендорф и осаждали при помощи центрифуги в течение 5 минут при 100g. Супернатанты были отобраны и заморожены при -20°C до момента использования. Осадок клеточной суспензии разводили ФБ до конечного объема 1 мл. Количество клеток подсчитывали при помощи камеры Горяева (Минимед, Россия). Далее проводили осаждение клеточной суспензии на стекло при помощи цитоцентрифуги (Shendon Cytospin II, Великобритания). Чтобы осадить клетки монослоем концентрация наносимой клеточной суспензии не должна была превышать 0,5 млн/мл, а объем образца не

более 200 мкл. Центрифугирование проводили в течение 5 минут при 500 оборотах/минуту. Осажденные клетки после высушивания фиксировали и

4.6. Определение цитокинов с помощью проточной цитометрии

Определение концентрации Th2-ассоциированных цитокинов в БАЛ и сыворотке крови мышей проводили методом проточной цитометрии с использованием набора LEGENDplex Mouse Th Cytokine Panel (Biolegend, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для определения концентрации цитокинов в БАЛ в лунки 96-луночного круглодонного планшета (Costar, США) вносили 25 мкл буферного раствора, 25 мкл раствора образцов или стандартов (соответственно), 25 мкл микросфер с сорбированными на них антителами к цитокинам, 25 мкл детектирующих антител (Рис. 5). В случае определения концентрации цитокинов в сыворотке крови в лунки со стандартами вместо буферного раствора добавляется раствор Matrix В. После 2-часовой инкубации на шейкере при комнатной температуре в каждую лунку добавлялось 25 мкл конъюгата Стрептавидина с фикоэритрином (SA-PE), который связывается с биотинилированными детектирующими антителами, обеспечивая флюорисцентный сигнал, интенсивность которого пропорциональна количеству связанных антител. После 30-минутной инкубации проводится забор супернатанта и однократная отмывка. Затем в каждую лунку добавляется 200 мкл wash buffer (буфера для отмывки) и проводится оценка количества цитокинов методом проточной цитофлуориметрии.

В работе использовали цитометр FACSCalibur (BD Biosciences, США), укомплектованный двумя лазерами 488 и 640 нм со стандартными детекторами и фильтрами. Цитокины определяли на диаграмме переднего малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния по размеру микросфер и по окрашиванию антителами (Рис. 6). При каждом цитометрическом измерении анализировали не менее 10000 событий в выделенном регионе. Данные обрабатывали с помощью специализированной программы для обсчета цитометрических данных: LEGENDplex 8.0 (Biolegend, США).



Рисунок 5. Схема проведения проточной цитометрии с использованием набора LEGENDplex Mouse Th Cytokine Panel (Biolegend, США). Изображение предоставлено производителем набора с сайта biolegend.com. SA-PE: конъюгат Стрептавидина с фикоэритрином, WB: Wash buffer (буффер для отмывки и итогового разведения образцов).

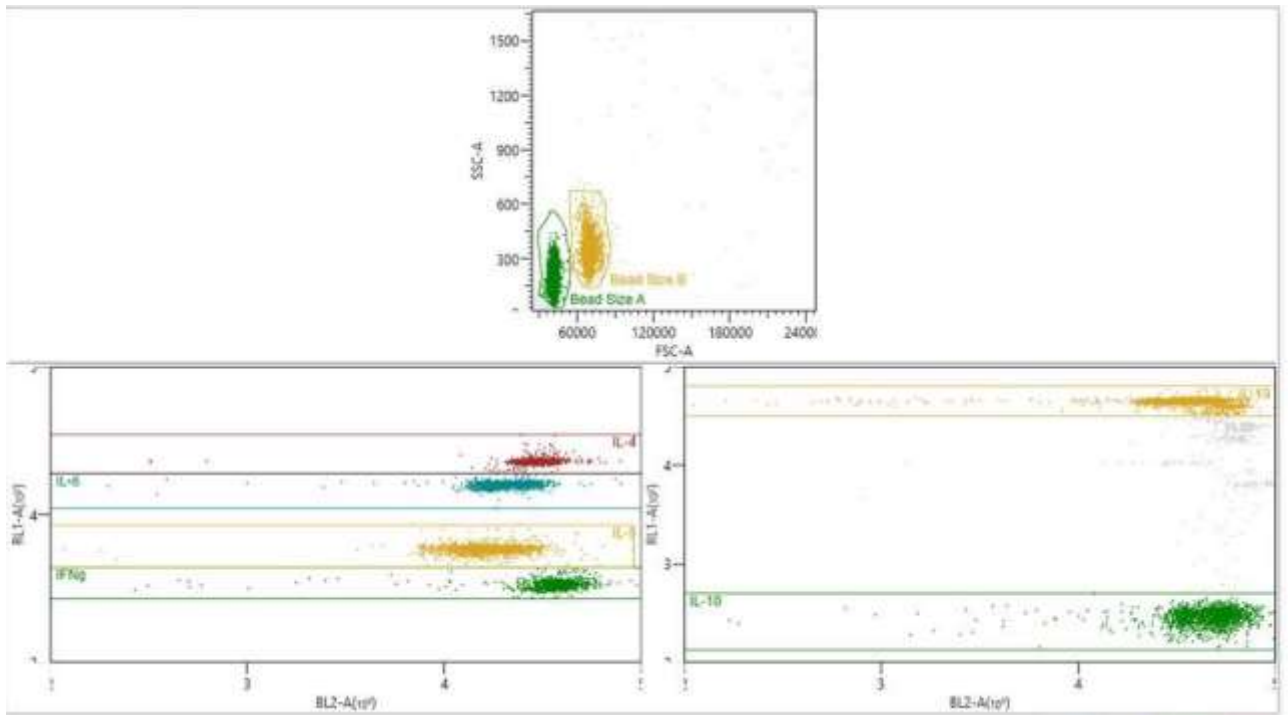


Рисунок 6. Данные, получаемые при проточной цитофлуориметрии. Микросферы с сорбированными антителами отличаются по размеру: на более крупных (Beads size A) сорбированы антитела к IL-4, - 6, - 5, IFN- γ ; на более мелких (Beads size B) сорбированы антитела к IL-10, -13. Приведенное изображение получено для стандарта в разведении 10000 пг/мл.

4.7. Иммуноферментный анализ

4.7.1. Определение содержания иммуноглобулинов

Уровни общих и антиген-специфических иммуноглобулинов в лаважных смывах и сыворотках периферической крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). В тестах использовали 96-луночные планшеты высокой сорбции для ИФА (Linbro, Великобритания). Для определения специфических антител в лунки вносили по раствор антигена в ФБ в концентрации 5 мкг/мл, конечный объем 100 мкл. Для определения общих антител на дно планшета сорбировали улавливающие антитела, растворенные в ФБ в концентрации рекомендованной производителем, в частности определение общего IgE проводили при помощи набора ELISA MAX™ Standard Sets (Biolegend, США). Проводили инкубацию сорбированных антител или антигенов в течение ночи при +4°C.

Планшеты отмывали трижды 0,05% Tween-20 в ФБ (Т-ФБ). После этого блокировали неспецифическое связывание путем добавления в лунки 1% БСА-ФБ. Через 30 минут планшет отмывали Т-ФБ, затем вносили сыворотки мышей, разведенные в БСА-ФБ или лаважные смывы. После часовой инкубации при комнатной температуре, проводили отмывку, как описано выше. Затем инкубировали час с антителами anti mouse IgG, IgA, или IgE HRP (Phara-Mingen, США), разведенными в БСА-ФБ 1:1000. После отмывки проводили окрашивание двухкомпонентным раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ, «НВО Иммунотех», Россия). Реакцию останавливали 10% серной кислотой в объеме 50 мкл на лунку. Оценку результата проводили по разности поглощения при 690 нм и 492 нм, измеренное с использованием прибора Multiskan FC (Thermo Scientific, Германия). Проводили контроль за неспецифическим связыванием реагентов и неспецифической реакцией субстрата. Далее проводили анализ полученных данных и построение графиков.

4.7.2. Определение концентрации внеклеточного БТШ70

Количественный анализ БТШ70 в полученных экстрактах оценивали методом твердофазного ИФА при помощи набора для определения БТШ70 (DuoSet IC, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, в лунки 96-луночного планшета для ИФА вносили по 100 мкл улавливающих антител в ФБ в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Затем планшет отмывали Т-ФБ как описано выше. Затем в лунки вносили блокирующий буфер (1% БСА-ФБ). Через 1 час проводили отмывку планшета, затем вносили разведенные в блокирующем буфере экстракты образцов. Планшеты инкубировали при комнатной температуре 2 часа, затем отмывали Т-ФБ. Далее проводили инкубацию в течение 2-х часов в присутствии конъюгированных с биотином вторых антител. Следующим этапом было нанесение по 100 мкл/лунку Streptavidin-HRP (Phara-Mingen, США). Инкубация длилась 20 минут при комнатной температуре, по завершению добавляли стоп-реагент. Окрашивание производили двухкомпонентным раствором субстрата («НВО Иммунотех», Россия). Реакцию останавливали добавлением 50 мкл/лунку 10% серной кислоты. Конечный результат измеряли, используя прибор Multiskan FC (Thermo Scientific, Германия), при

поглощении 450 нм. Далее проводили обсчет и построение графиков по полученным результатам.

4.7.3. Определение содержания цитокинов в бронхоальвеолярных смывах

Уровни продукции цитокинов определяли при помощи ИФА. IL-4 и IL-5 определяли с использованием наборов ELISA MAX Standard Sets (Biolegend, США), IL-13 с использованием ELISA Development Kit (PeproTech, США). В лунки 96-луночного планшета для ИФА вносили по 100 мкл раствора первых антител в ФБ в концентрации 0,5 мкг/мл. Инкубацию проводили в течение ночи согласно рекомендациям производителей. Планшеты трижды отмывали Т-ФБ. После чего в лунки вносили блокирующий буфер 1% БСА-ФБ. Через 1 час планшет трижды отмывали Т-ФБ. В лунки вносили лаважные жидкости иммунных мышей и стандарты. После двухчасовой инкубации при комнатной температуре, проводили отмывку. В лунки вносили вторые антитела в концентрации 0,5 мкг/мл на следующие два часа. После очередной отмывки проводили получасовую инкубацию с Streptavidin-HRP. После отмывки проводили окрашивание двухкомпонентным раствором субстрата ТМВ («НВО Иммунотех», Россия). Реакцию останавливали при помощи 10% серной кислоты 50 мкл/лунку. Затем по разности поглощения при 690 нм и 492 нм проводили оценку полученных результатов. Поглощение измеряли, используя прибор Multiskan FC (Thermo Scientific, Германия). Проводили контрольное окрашивание для выявления неспецифического связывания реагентов и неспецифическую реакцию субстрата.

4.8. Определение уровня внеклеточного АТФ

Уровень внеклеточного АТФ в надосадочных жидкостях БАЛ мышей определяли с помощью набора ENLITEN ATP Assay System (Promega, США), основанного на протекании люциферин-люциферазной реакции. Содержащий люциферин/люциферазу реагент добавляли к стандартам и образцам бронхоальвеолярных смывов мышей. При необходимости для разведения

использовали воду, не содержащую АТФ. Измерение хемилюминесценции проводили при помощи люминометра AutoLumat LB 953 (Berthold Technology, GmbH).

окрашивали при помощи набора «Диахим-Диффвик» (Диахим, Россия).

4.9. Выделение нейтрофилов из костного мозга мыши

4.9.1. Выделение клеток костного мозга мыши

Из задней конечности мыши линии BALB/c извлекали кости (tibia и femur) и промывали их через костный канал 5 мл охлажденного на льду раствора ФБ. Суспензию клеток костного мозга центрифугировали в стандартных условиях (10 минут при 1000 об/мин, +10°C). Осадок ресуспендировали гемолизирующим буфером (0,83% NH₄Cl; 0,084% NaHCO₃; 0.004% ЭДТА, все соли Merck, Германия) в объеме 3 мл/образец, выдерживали 10 минут при комнатной температуре, затем центрифугировали 10 минут при 1000 об/мин, +4°C. Клетки отмывали от лизирующего буфера дважды при помощи 5 мл ФБ. Центрифугирование проводили в стандартных условиях, как описано ранее. Подсчет клеток осуществляли при помощи камеры Горяева.

4.9.2. Выделение нейтрофилов из клеток костного мозга методом негативной селекции

Нейтрофилы выделяли из клеток костного мозга мышей методом негативной селекции с использованием набора для магнитной сепарации Neutrophil Isolation Kit (mouse) (Miltenyi Biotec, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, суспензию клеток, содержащую не более 5×10^7 клеток разводили MACS-буфером (0,5% БСА; 2mM ЭДТА, pH 7,2; ФБ) и последовательно инкубировали с коктейлем биотинилированных антител, специфичных к пулу клеток костного мозга, не относящихся к нейтрофилам; затем с анти-биотин конъюгированными магнитными частицами. Суспензию наносили на колонку в магнитном поле, что обеспечивало отделение нейтрофилов от остальных клеток костного мозга, которые, будучи связанными с магнитными частицами, задерживались на колонке. Выделенные нейтрофилы переводили в ФБ или раствор Хэнкса (ПанЭко, Россия) для

последующего определения внеклеточного содержания нуклеиновых кислот или образования внеклеточных ловушек соответственно.

4.9.3. Определение чистоты популяции нейтрофилов, выделенных из клеток костного мозга

4.9.3.1. Определение нейтрофилов по морфологическим признакам

С целью оценить чистоту популяции выделенных нейтрофилов аликвоту суспензии осаждали на стекло при помощи цитоцентрифуги и окрашивали ядра и цитоплазму с помощью набора «Диахим-Диффквик».

4.9.3.2. Определение нейтрофилов с помощью проточной цитометрии

Часть клеток переводили в буфер для цитометрии (0,1% БСА; 0,05% NaN₃; ФБ) и окрашивали антителами против Ly6G (clone RB6-8C5), конъюгированными с FITC, и против CD11b, конъюгированными с PE-Cy5 (все антитела eBioscience, США). Анализ процента Ly6G⁺CD11b⁺ клеток в образце нейтрофилов, выделенных из костного мозга мыши путем негативной селекции, оценивали методом проточной цитометрии. В работе использовали цитометр FACSCalibur (BD Biosciences, США), укомплектованный двумя лазерами 488 и 640 нм со стандартными детекторами и фильтрами. Нейтрофилы определяли по морфологическим параметрам на диаграмме переднего малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния и по окрашиванию антителами к Ly6G и CD11b. При каждом цитометрическом измерении анализировали не менее 10000 событий в выделенном регионе. Данные обрабатывали с помощью специализированных программ для обчета цитометрических данных: CellQuest ver. 3.3 (BD Biosciences, США), WinMDI 2.8.

4.9.4. Определение влияния БТШ70 на активацию культивированных нейтрофилов

4.9.4.1. Активация нейтрофилов костного мозга мыши

Активацию выделенных из костного мозга нейтрофилов проводили фарбол-12-мирилат-13-ацетатом (РМА) (Sigma, США) в диапазоне концентраций 0,005-50 μM . С целью исследовать эффект БТШ70 на активацию нейтрофилов, БТШ70 добавляли вместе с активаторами нетоза; диапазон конечных концентраций составлял 2 нМ – 0,2 μM . С целью подтвердить специфичность эффекта в качестве релевантного белка использовали БСА, имеющий, как и БТШ70, молекулярную массу 70 кДа, в соответствующих концентрациях. В ряде экспериментов в качестве контроля был использован LPS free ОВА.

4.9.4.2. Определение внеклеточного содержания нуклеиновых кислот

Определение внеклеточного содержания нуклеиновых кислот производилось аналогично протоколу, описанному Barrientos et al. (Barrientos L., Marin-Esteban V. et al., 2013). Нейтрофилы разводили в ФБ до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл и добавляли 5 мкМ SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Molecular probes, США) – не проникающий в клетки, связывающий нуклеиновые кислоты реагент. Полученную суспензию клеток вносили по 200 мкл/лунку 96-луночного планшета и инкубировали в течение 4 часов (+37°C, 5% CO₂) в присутствии РМА и БТШ70. Измерения проводили каждый час при помощи планшетного флуорометра/люминометра GloMax-Multi Detection System (Promega, США). Уровень флуоресценции образцов определяли в относительных единицах флуоресценции.

4.9.4.3. Определение образования внеклеточных сетей нейтрофилами (NETs)

Суспензию нейтрофилов в растворе Хэнкса (HBSS) наносили на покровные стекла, помещенные на дно планшета и предварительно покрытые поли-L-лизинном. Клетки вносили в концентрации 1×10^6 клеток/мл по 500 мкл/лунку 12-луночного

планшета. Инкубацию проводили в течение 4 часов (+37°C, 5% CO₂) в присутствии активаторов и, где требовалось, БТШ70 или релевантного белка (БСА, ОВА). По истечении срока инкубации препараты промывали двукратным объемом ФБ (1 мл), фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 минут и промывали ФБ три раза.

Далее ядра активированных нейтрофилов окрашивали Hoechst 33342 (Invitrogen, США); для заливки использовали преокрашенные среды ActinGreen 488 (ReadyProbes, Life Technologies), окрашивающую хроматин, и ProLong Gold (Molecular Probes, Life Technologies). Визуализацию NETs проводили при помощи конфокальной микроскопии (Nikon C1, Япония).

4.9.4.4. Регистрация спонтанного апоптоза в первичной культуре нейтрофилов

Для определения уровня спонтанного апоптоза выделенные нейтрофилы мыши инкубировали 20 часов в RPMI с 10% телячьей сывороткой при 5% CO₂ и +37°C. Апоптоз регистрировали с помощью набора AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, в суспензию клеток добавляли AnnexinV-FITC, связывающий фосфатидилсерин, появляющийся на поверхности клеток в процессе апоптоза, а затем пропидий-йодид, проникающий в клетки при нарушении целостности мембраны. Для исследования эффектов БТШ70 белок в концентрации 1⁻¹⁰ мкг/мл добавляли к нейтрофилам перед началом 20-часовой инкубации. В качестве контроля использовали БТШ70, подвергшийся кипячению в течение 30 минут. Для индукции апоптоза в нейтрофилах (положительный контроль) использовали стауроспорин (Sigma, США). Исследование проводили методом проточной цитометрии.

4.10. Выделение и культивирование ДК из костномозговых предшественников

ДК получали из клеток костного мозга мышей. Из задней конечности мыши извлекали кости (*tibia* и *femur*) и промывали их через костный канал 5 мл охлажденной на льду среды RPMI (Gibco, Life Technologies, Германия). Суспензию клеток костного мозга фильтровали через сито 100 мкм (SPL Life Sciences, Корея) и

центрифугировали при 1400 об/мин на центрифуге SORVALL (Thermo Scientific, США). С целью лизировать эритроциты осадок был обработан лизирующим буфером (8,29г NH_4Cl ; 0,037г Na_2EDTA ; 0,839г NaHCO_3 ; довести до 1000 мл бидистиллированной водой) с последующими отмытками RPMI. Клетки разводили до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл и культивировали в 6-луночной планшете в течение 9 дней в присутствии ГМ-КСФ. Замену среды и добавление ГМ-КСФ осуществляли каждые 3 дня.

4.11. Исследование индуцированного хемотаксиса ДК

Для определения хемотаксиса ДК, клетки отмывали в ФБ (Gibco, Life Technologies, Германия) и разводили в питательной среде RPMI. Для постановки теста использовали планшеты Transwell Permeable Support (Corning, США) с мембраной 5 мкм. В нижнюю емкость планшетов добавляли аттрактанты, в том числе АТФ (Sigma, США), АДФ (Sigma, США), БТШ70, предварительно разведенные в ФБ до необходимой концентрации; в контрольную лунку добавляли ФБ. В верхнюю емкость планшета добавляли клетки в концентрации 100000 клеток/лунку (Рис. 7). После сборки систему инкубировали 90 минут при $+37^\circ\text{C}$. Прошедшие в нижнюю емкость планшета клетки центрифугировали при 3000 об/мин на центрифуге Biofuge В Heraeus (Thermo Scientific, Германия) и подсчитывали с использованием камеры Горяева. Индекс хемотаксической активности определяли как отношение количества клеток, мигрировавших в ответ на соответствующий аттрактант к количеству клеток, мигрировавшему в ответ на добавление фосфатного буфера.

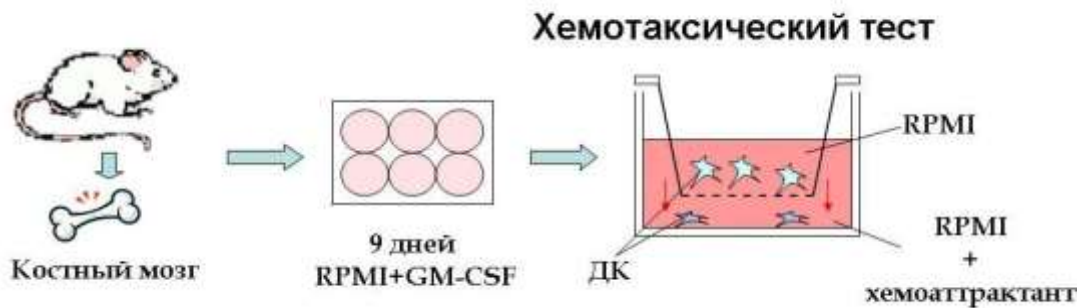


Рисунок 7. Схема исследования хемотаксиса ДК в ответ на различные аттрактанты с использованием планшетов Transwell Permeable Support.

4.12. Статистическая обработка результатов

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы для статистической обработки данных GraphPad Prism версия 6.0 для Windows (GraphPad Software, Сан Диего, США). На графиках представлены средние значения и стандартная ошибка. В зависимости от поставленных задач и способа формирования групп для исследования, полученные данные подвергались анализу с помощью следующих тестов: для сравнения количества клеток между различными группами животных использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, для сравнения количества гуморальных факторов использовали t-критерий Стьюдента. В каждом случае различие значений при $p < 0.05$ рассматривалось как достоверное.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

5.1. Разработка мышинной модели индуцированного АДП в условиях антиортостатического вывешивания

5.1.1. Сравнение длительной и краткосрочной модели АДП

Поскольку далеко не каждая из существующих различных мышинных моделей АДП подходит для комбинирования с моделью антиортостатического вывешивания нижних конечностей, то необходимо было выбрать оптимальную. Для этой цели на основе литературных данных нами было выбрано две модели: длительная и краткосрочная. При увеличении количества введений аллергена и увеличения длительности модели отмечалось достоверное увеличение общего количества клеток в БАЛ, что мы и наблюдали в длительной модели по сравнению с краткосрочной (Рис. 8 А). При этом доля эозинофилов в длительной и краткосрочной модели достоверно не отличалась (Рис. 8 Б).

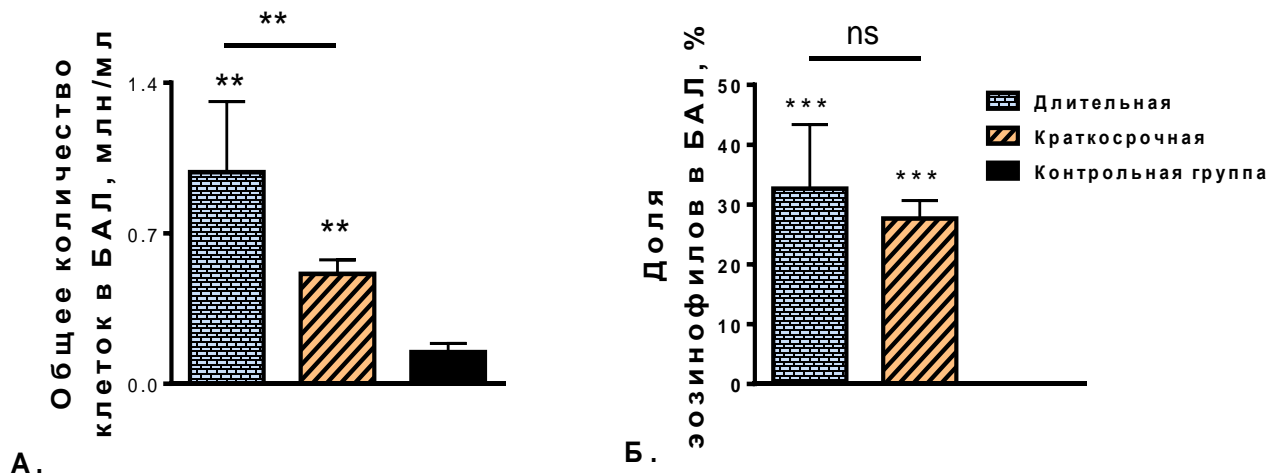


Рисунок 8. Сравнение длительной и краткосрочной моделей АДП у мышей: (А) Сравнение общего количества клеток в БАЛ (млн/мл). (Б) Оценка доли эозинофилов в БАЛ (%). Проводили сравнение между показателями длительной модели, краткосрочной модели и контрольной группы мышей. На графиках представлены средние значения \pm S.D., (n = 5). Статистические значения обозначали: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ns – отсутствие достоверного отличия.

Общее количество клеток в БАЛ и доля эозинофилов в краткосрочной модели были достоверно выше, чем у контрольной группы мышей (Рис. 8 А, Б).

На основе полученных данных был сделан вывод, о том, что с учетом длительности описанных моделей, более предпочтительно, а с учетом показателей локального клеточного ответа, возможно использование краткосрочной модели АВДП совместно с антиортоstaticическим вывешиванием.

5.1.2. Сравнение краткосрочной модели с использованием ОВА различной степени очистки от липополисахарида

При подборе модели АВДП было проведено сравнение моделей с использованием ОВА различной степени очистки. Известно, что примесь LPS вызывает приток нейтрофилов (Idzko M., Hammad H. et al., 2007), что не было приоритетным в данном исследовании. Для того чтобы избежать побочных эффектов LPS, был выбран ОВА высокой степени очистки (LPS free ОВА) и ОВА средней степени очистки (ОВА grade V).

При использовании LPS free ОВА общее количество клеток было ниже, чем с использованием ОВА grade V, и достоверно не отличалось от контрольной группы (Рис. 9).

Доля эозинофилов в модели с использованием LPS free ОВА была выше, чем в группе с ОВА grade V, и достоверно выше, чем у контрольной группы. При этом абсолютное количество эозинофилов в группе LPS free ОВА достоверно не отличалось по сравнению с группой с ОВА grade V (Рис. 10 А, Б.).

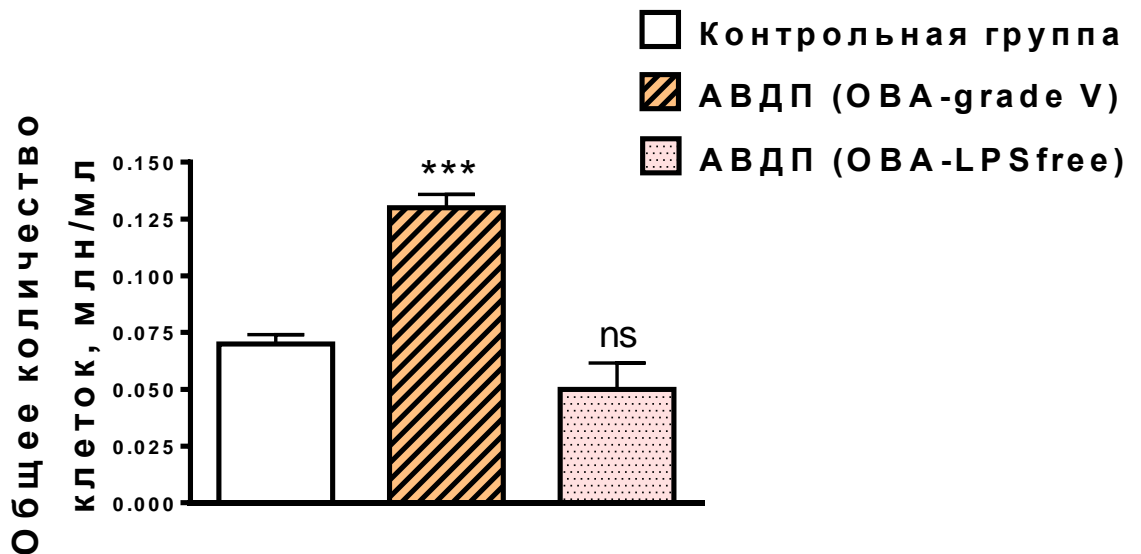


Рисунок 9. Оценка общего количества клеток в БАЛ (млн/мл) при сравнении моделей с использованием овальбумина разной степени очистки: ОВА grade V и LPS free ОВА. На графиках представлены средние значения \pm S.D., ($n = 5$). Статистические отличия: *** $p \leq 0,001$; ns – отсутствие достоверного отличия.

В группе с использованием LPS free ОВА количество нейтрофилов было значительно ниже, чем в группе с ОВА grade V, и достоверно не отличалось от контрольной группы (Рис. 10 А, Б).

Модель индукции АВДП состоит из следующих этапов: индукция системного ответа и индукция локального ответа в дыхательных путях. Для оценки влияния опорной разгрузки и на тот и на другой этап АВДП необходимо проводить вывешивание на весь период моделирования АВДП, поскольку в этом случае будут созданы условия, максимально приближенные к условиям КП.

По данным Yang T.Y. и соавт. (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015) при использовании альтернативной модели АВДП совместно с антиортостатическим вывешиванием только на период индукции локального иммунного ответа количество клеток в БАЛ было ниже, чем у мышей в условиях нормальной нагрузки. Исходя из этого, 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 ОВА grade V. Достоверное увеличение общего количество клеток в БАЛ по сравнению с контрольной группой было необходимо для того, чтобы обеспечить возможность оценить наличие и интенсивность воспаления в легких.

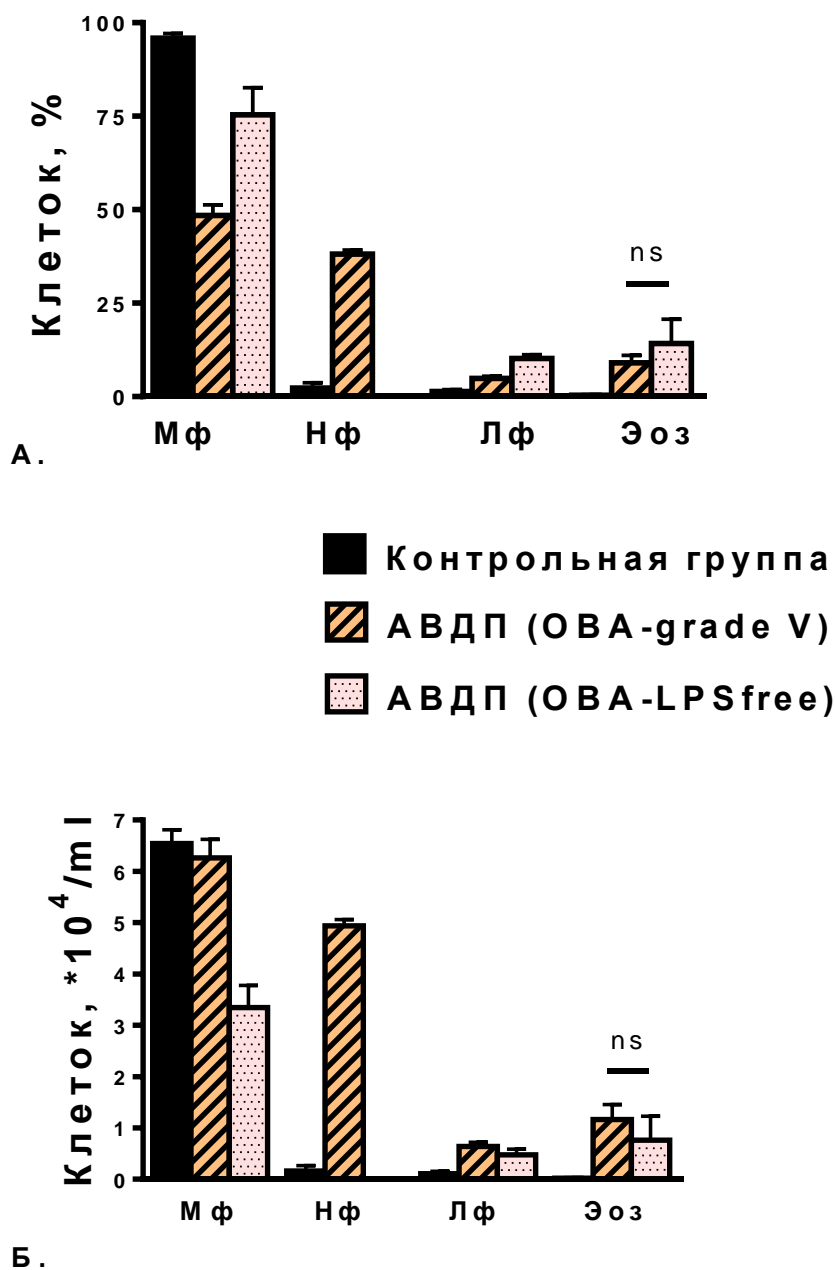


Рисунок 10. Сравнение моделей АВДП у мышей с использованием LPS free ОВА и ОВА grade V: (А) Сравнение доли различных клеток в БАЛ (%). Проводили сравнение между показателями модели с использованием ОВА grade V, модели с использованием LPS free ОВА и контрольной группой; (Б) Сравнение абсолютного количества клеточных элементов в БАЛ (млн/мл). На графиках представлены средние значения \pm S.D., (n = 5). ns – отсутствие достоверного отличия.

5.2. Оценка особенностей воспалительного ответа у мышей в условиях антиортостатического вывешивания

На основе проведенных экспериментов была разработана модель АВДП в условиях моделируемой опорной разгрузки, которая состоит из антиортостатического вывешивания длительностью 23 суток. В течение вывешивания проводили индукцию системного иммунного ответа с применением ОВА grade V путем интраперитонеальных инъекций на 0 и 7 сутки вывешивания, а также индукция локального иммунного ответа путем интрафарингеального введения раствора ОВА grade V в фосфатном буфере на 19, 20, 21 сутки вывешивания.

На момент окончания эксперимента у контрольной группы и группы в условиях вывешивания не отмечалось достоверных различий в изменении веса мышей. При этом в группе мышей с индуцированным АВДП в условиях вывешивания отмечалось снижение веса по сравнению с контрольной группой, однако по сравнению с группой в условиях вывешивания изменения были не достоверны. (Рис. 11 А). Также не отмечалось различий между нормализованными массами селезенки по отношению к массе мышей между исследуемыми группами при вывешивании и в условиях нормальной опорной нагрузки (Рис. 11 Б).

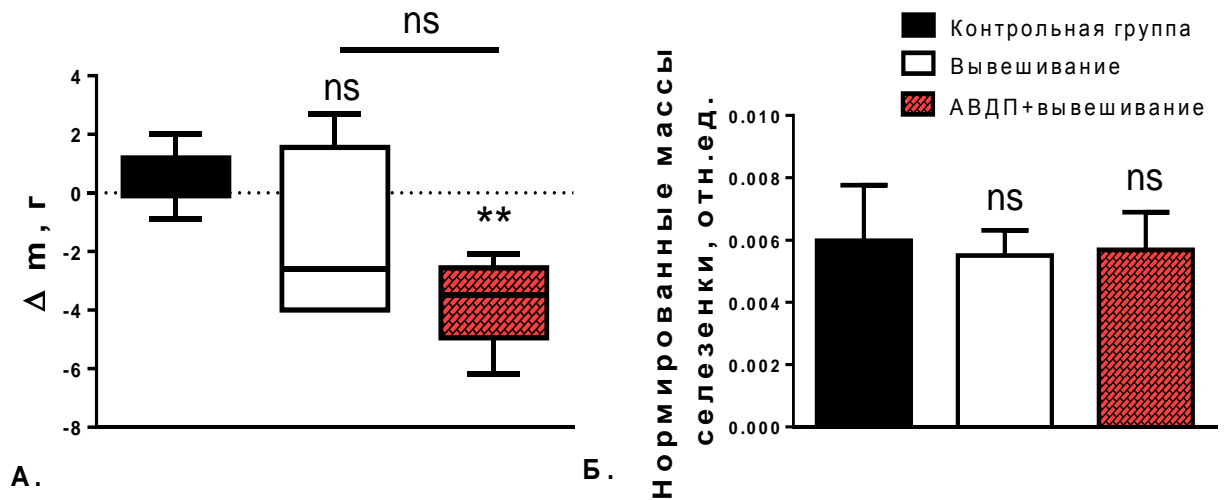


Рисунок 11. (А) Изменение веса мышей на момент окончания эксперимента в исследуемых и контрольной группе. (Б) Сравнение изменения отношений массы селезенки к массе тела у исследуемой и контрольной групп. Статистические значения обозначали: ** $p \leq 0,01$; ns – отсутствие достоверного отличия.

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

Был проведен ряд экспериментов, направленных на изучение особенностей иммунного ответа в условиях антиортостатического вывешивания. На первом этапе проводилось сравнение параметров клеточного ответа в легких мышей.

В БАЛ контрольных мышей и мышей в условиях вывешивания были обнаружены преимущественно макрофаги (Рис. 12 А, Б). Эозинофилы были обнаружены только в группах мышей с АВДП, как в условиях нормальной нагрузки, так и при вывешивании (Рис. 12 В, Г). Количественный анализ показал, что в отсутствие воспаления вывешивание не оказывало влияние на общее количество клеток в бронхоальвеолярных лаважах по сравнению с контрольной группой (Рис. 13). Было показано, что в разработанной модели АВДП в условиях опорной разгрузки инфильтрация лейкоцитов в дыхательные пути была достоверно выше, чем у мышей с вывешиванием без АВДП, при этом она достоверно снижалась по сравнению с группой с АВДП без вывешивания (Рис. 13 А).

Детальный анализ показал, что в отсутствие воспаления доли нейтрофилов и эозинофилов у мышей, подвергавшихся вывешиванию, не отличались от соответствующих показателей у контрольной группы мышей (Рис. 12 А, Б, 13 Б, В). Процент нейтрофилов при воспалении в условиях вывешивания хотя и отличался от этого показателя у мышей с воспалением без вывешивания, но различия были не достоверны (Рис. 13 Б). Доля эозинофилов, являющихся основным признаком аллергического воспаления, в БАЛ мышей с индуцированным в условиях антиортостатического вывешивания АДП была достоверно выше по сравнению с контрольной группой, но снижена по сравнению с долей эозинофилов у мышей с АДП, не подвергавшихся вывешиванию (Рис. 12 В, Г, 13 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.

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.

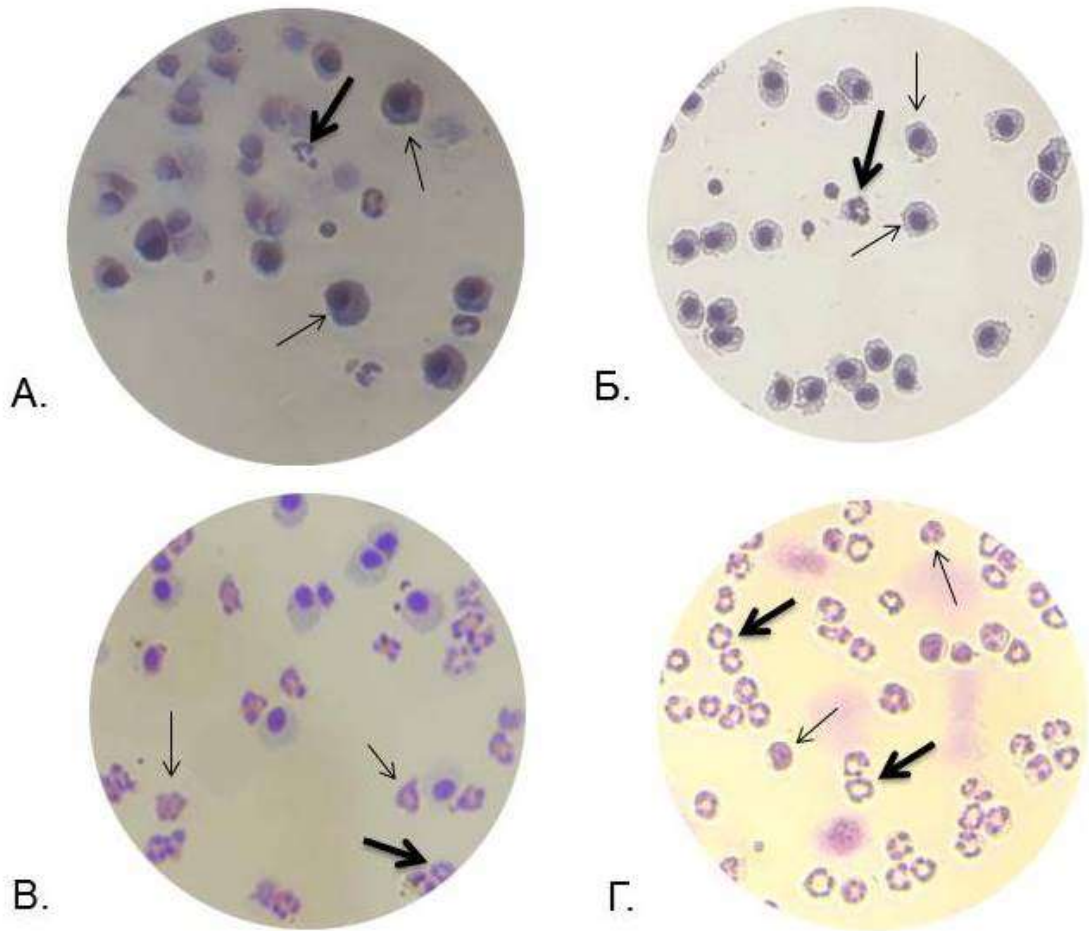


Рисунок 12. Определение клеточного состава бронхоальвеолярного лаважа мышей линии BALB/c, окраска «Диахим-Диффквик», увеличение 500×: (А) Контрольная группа, (Б) Группа мышей в условиях антиортостатического вывешивания, (В) Группа мышей с индуцируемым АВДП в условиях нормальной нагрузки, (Г) Группа мышей с индуцируемым АВДП в условиях опорной разгрузки.

(А), (Б) Тонкими стрелками указаны макрофаги,

(В), (Г) Тонкими стрелками указаны эозинофилы,

(А), (Б), (В), (Г) Толстыми стрелками указаны нейтрофилы.

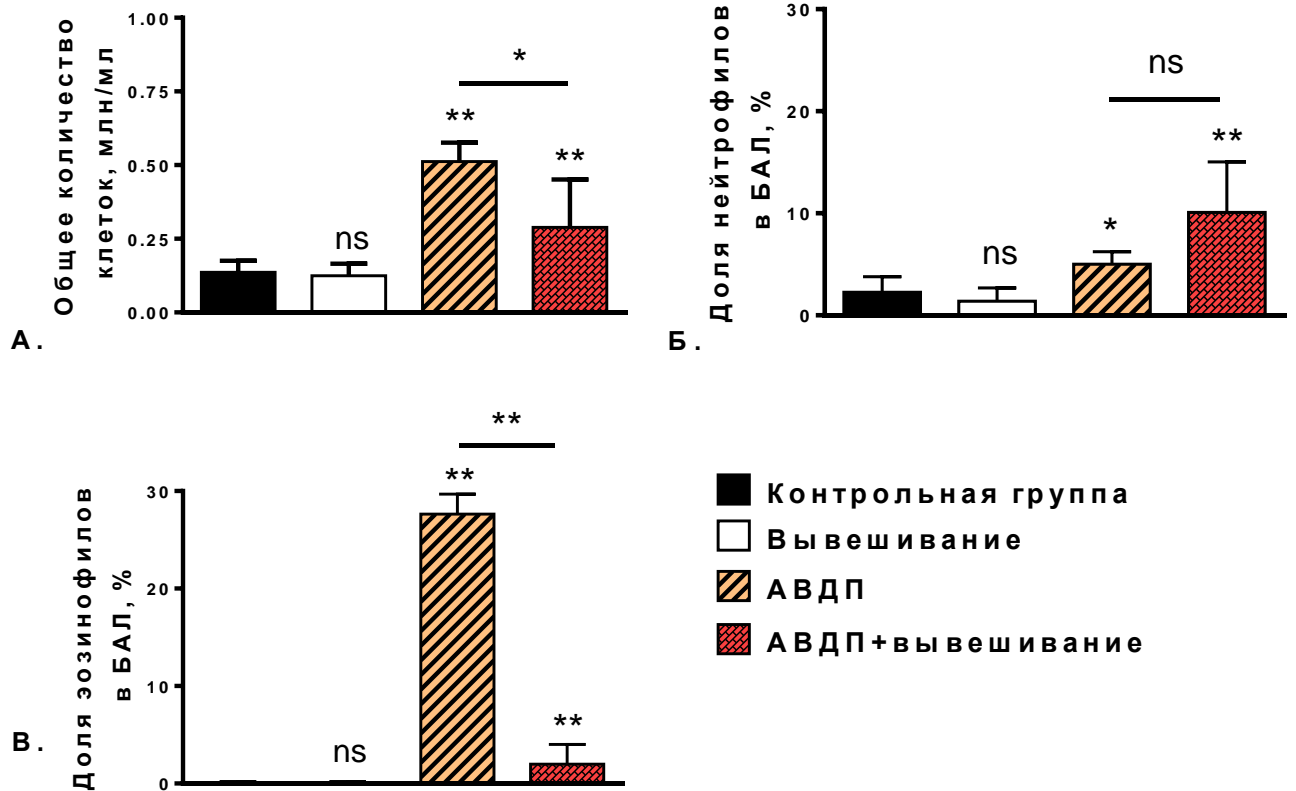


Рисунок 13. Влияние антиорто статического вывешивания на интенсивность АВДП у мышей: (А) Сравнение общего количества клеток в БАЛ. (Б) Сравнение доли нейтрофилов в БАЛ, %. (В) Сравнение доли эозинофилов в БАЛ, %. Сравнение производится между исследуемыми группами (помечены крышками), а также между исследуемыми группами и контрольной группой (помечены звездочкой над столбцом). Представленные величины – средние значения \pm S.D. (7 мышей в группе). Статистические значения обозначали: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns – отсутствие достоверного отличия.

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

Для определения особенностей формирования про-аллергического иммунного ответа в условиях вывешивания на втором этапе проводилось сравнение системного IgE-опосредованного гуморального ответа в сыворотках периферической крови мышей.

При сравнении контрольной группы мышей и группы с вывешиванием было показано, что вывешивание не влияет на уровень общего IgE (Рис. 14). При индукции АДП в условиях вывешивания отмечалось достоверное увеличение уровня общего IgE по сравнению с контрольной группой и группой мышей с вывешиванием (Рис. 14). Необходимо отметить, что 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. 14).

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.

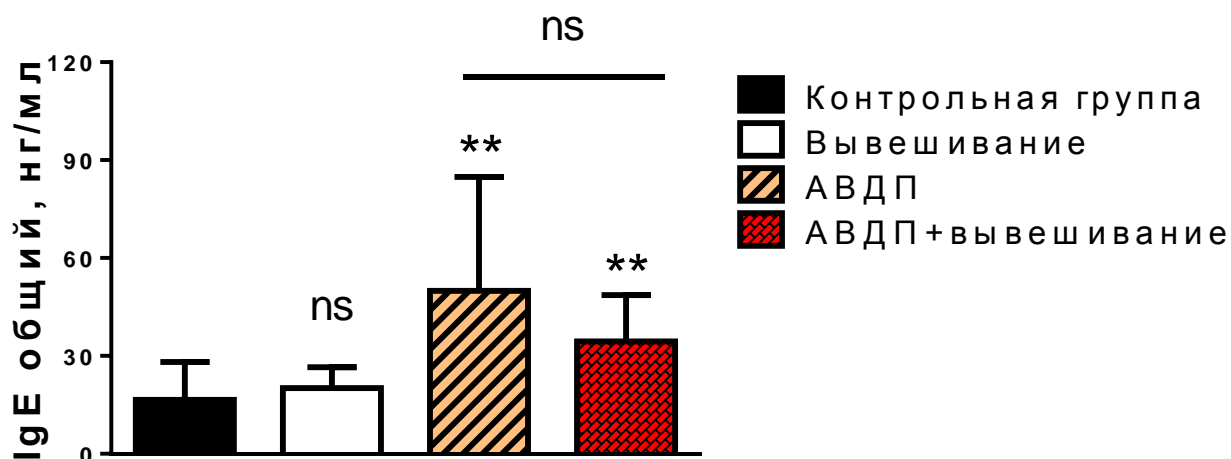


Рисунок 14. Сравнение содержания общего IgE (нг/мл) в сыворотке периферической крови мышей контрольной группы, группы с вывешиванием, группы с АДП в условиях нормальной нагрузки и группы с АДП в условиях антиортостатического вывешивания. Представленные величины – средние значения \pm S.D. (7 мышей в группе). Статистические значения обозначали: ** $p \leq 0,01$, ns – отсутствие достоверного отличия.

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

5.2.3.1. Локальный цитокин-опосредованный ответ

При изучении локального гуморального ответа при индукции АВДП 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 индуцированным АВДП были ниже порога чувствительности используемого набора (данные не приведены).

Само по себе вывешивание не влияло на концентрацию таких провоспалительных цитокинов, как IL-4, IL-5, IL-6 (Рис. 15, 16, 17). При индукции АВДП в условиях опорной разгрузки отмечалось достоверное увеличение концентрации IL-4 в БАЛ мышей по сравнению с контрольной группой (Рис. 15). Известно, что IL-4 ассоциирован с Th2- опосредованным иммунным ответом. В частности, он отвечает за контроль пролиферации, дифференцировки и функциональной активности В-лимфоцитов, т.е. за антительный ответ (Robinson M.J., Prout M. et al., 2017, Granato A., Hayashi E.A. et al., 2018, Ruiz-Lafuente N., Muro M. et al., 2018, Sugamata R., Donko A. et al., 2019). Таким образом, повышенная продукция локального IL-4 коррелирует с обнаруженным нами ранее повышенным системным уровнем IgE в модели АВДП в условиях антиортостатического вывешивания.

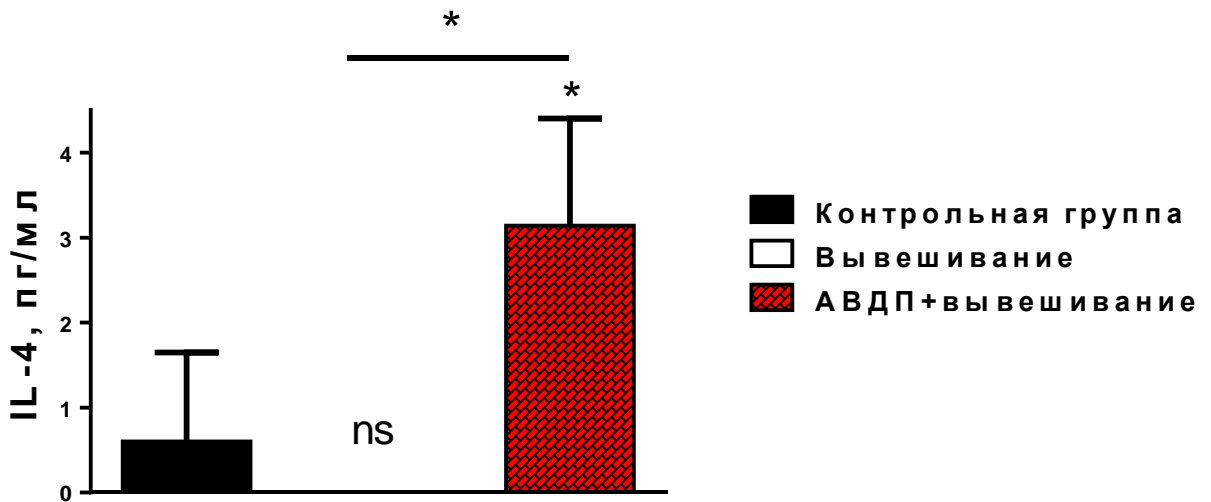


Рисунок 15. Влияние индукции АВДП на концентрацию IL-4 (пг/мл) в условиях антиортостатического вывешивания в БАЛ мышей (7 мышей в группе). Статистические значения обозначали: * $p \leq 0.05$; ns – отсутствие достоверных отличий.

Помимо этого, отмечалась тенденция к увеличению концентрации IL-5 в БАЛ мышей с индуцированным АВДП в условиях опорной разгрузки, принимающего участие в хемоаттракции эозинофилов, однако отличия от контрольной группы были не достоверны (Рис. 16).

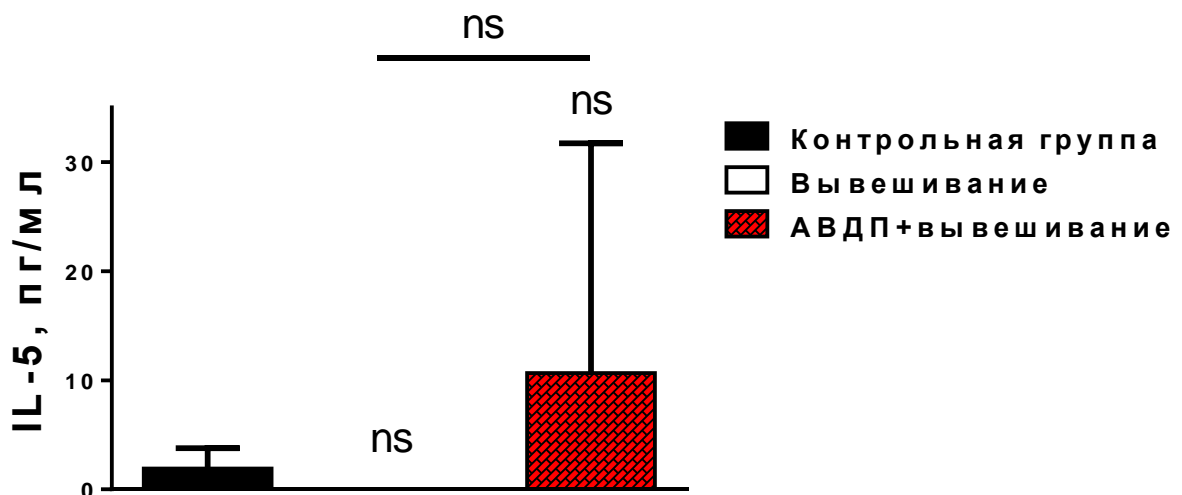


Рисунок 16. Влияние индукции АВДП на концентрацию IL-5 (пг/мл) в условиях антиортостатического вывешивания в БАЛ мышей (7 мышей в группе). Статистические значения обозначали: ns – отсутствие достоверных отличий.

Также отмечалось достоверное повышение концентрации IL-6 при моделировании АДП в условиях опорной разгрузки (Рис. 17). Известно, что увеличение секреции IL-6 коррелирует со степенью тяжести аллергического воспаления (Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A. et al., 2018).

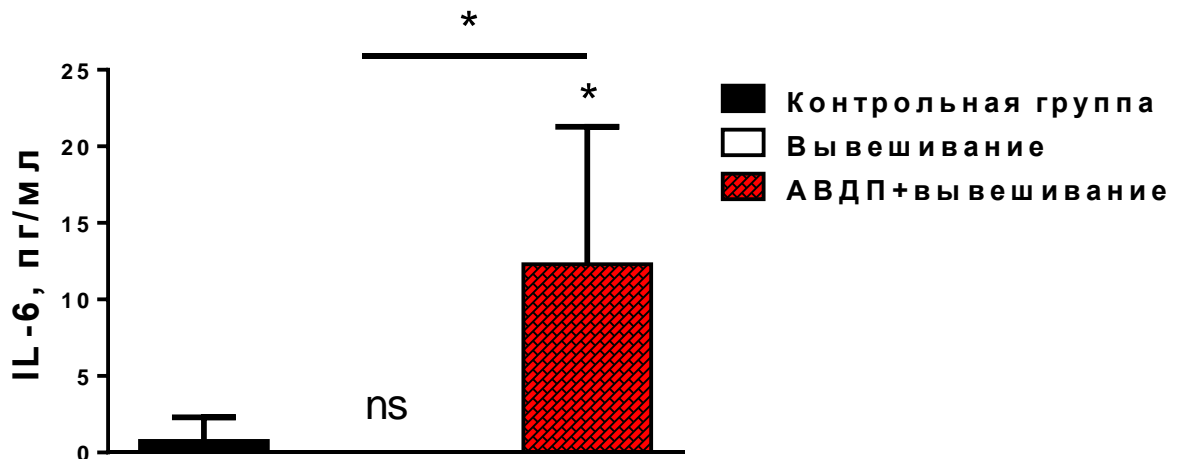


Рисунок 17. Влияние индукции АДП на концентрацию IL-6 (пг/мл) в условиях антиортостатического вывешивания в БАЛ мышей (7 мышей в группе). Статистические значения обозначали: * $p \leq 0.05$; ns – отсутствие достоверных отличий.

Таким образом, локальный гуморальный ответ при моделировании АДП в условиях опорной разгрузки носит про-аллергический и провоспалительный характер. При этом отмечается дефицит противовоспалительных цитокинов, а именно IL-10.

5.2.3.2. Системный цитокин-опосредованный ответ

При изучении системного гуморального ответа при индукции АДП в условиях антиортостатического вывешивания также проводили изучение изменения концентрации цитокинов IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN γ . Анализ секреции цитокинов не выявил детектируемого уровня IL-10 в сыворотке периферической крови мышей с индуцированным АДП в условиях опорной разгрузки, а также у мышей контрольной группы и мышей, подвергавшихся вывешиванию (данные не приведены). 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 INF γ в сыворотке крови мышей (Рис. 18, 19). Однако при индукции АДП в условиях вывешивания отмечалось достоверное повышение концентрации IL-5, что коррелировало с ранее выявляемой эозинофилией дыхательных путей (Рис. 18).

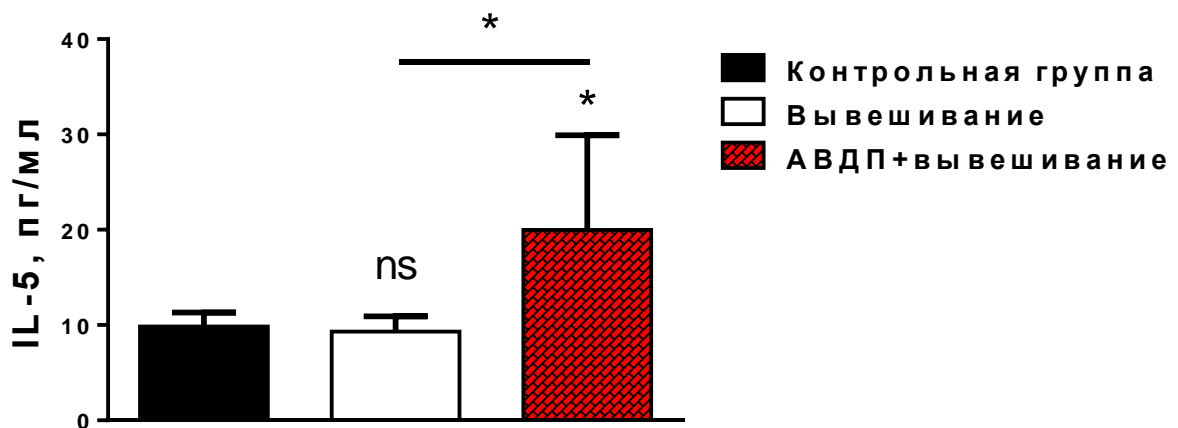


Рисунок 18. Влияние индукции АДП на концентрацию IL-5 (пг/мл) в условиях антиортостатического вывешивания в сыворотке крови мышей (7 мышей в группе). Статистические значения обозначали: * $p \leq 0.05$; ns – отсутствие достоверных отличий.

При этом концентрация INF 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. 19). Поскольку INF 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 со стороны иммунной системы.

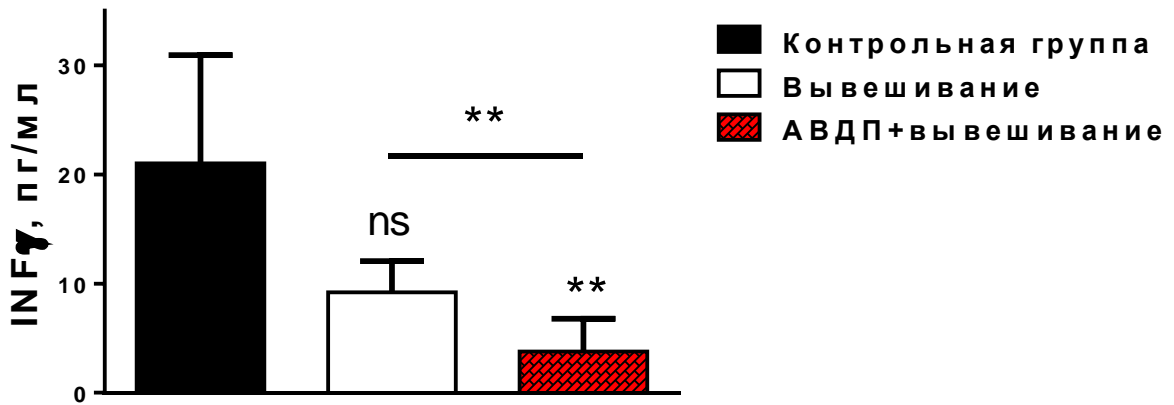


Рисунок 19. Влияние индукции АВДП на концентрацию INF γ (пг/мл) в условиях антиорто статического вывешивания в сыворотке крови мышей (7 мышей в группе). Статистические значения обозначали: ** $p \leq 0.001$; ns – отсутствие достоверных отличий.

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

5.3. Динамика секреции БТШ70 в процессе развития АВДП в условиях нормальной опорной нагрузки

Для того чтобы оценить вовлеченность БТШ70 в процесс воспаления при аллергической бронхиальной астме нами была использована краткосрочная овальбумин-индуцированная модель АВДП как описано выше. Вкратце, мыши получали интраперитонеальные инъекции адсорбированного на алюминиевых квасцах овальбумина в концентрации 10 мкг/мышь на 0 и 7 день от начала эксперимента, затем 0,1% раствор ОВА в ФБ вводили мышам интрафарингеально на 19, 20 и 21 день (Рис. 20).

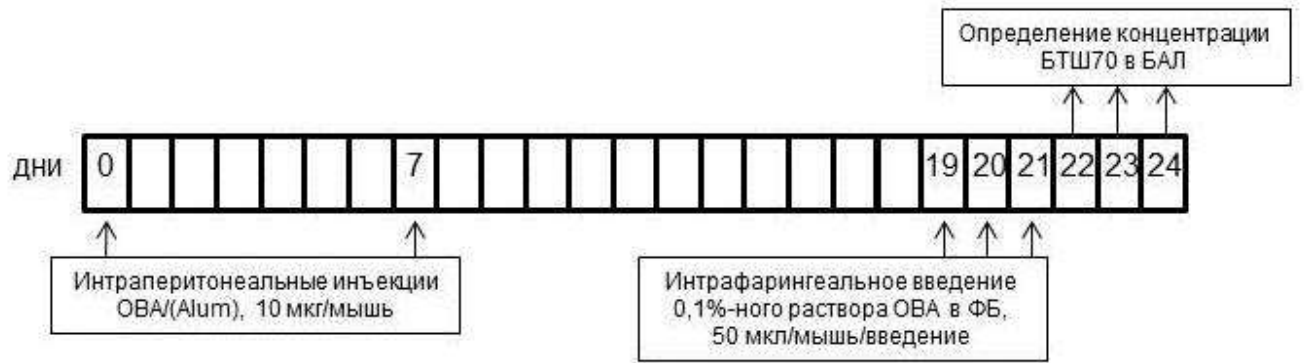


Рисунок 20. Схема индукции АДП с использованием овальбумина для последующего определения динамики концентрации эндогенного БТШ70 в БАЛ мышей.

Концентрацию внеклеточного БТШ70 в бронхоальвеолярных смывах 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 достоверно превышал уровень БТШ70, определяемый в лаважных смывах преиммунных мышей (Рис. 21).

Долгое время считалось, что повышение концентрации БТШ70 в межклеточном пространстве, наблюдаемое при воспалительных процессах служит «сигналом опасности» (Quintana F.J. Cohen I.R., 2005, Asea A., 2008). Однако, данные последних лет (Stocki P. Dickinson A.M., 2012) в совокупности с ранее описанной шаперонной активностью БТШ (Palleros D.R., Welch W.J. et al., 1991, Srivastava P., 2002, Joly A.L., Wettstein G. et al., 2010) позволяет предположить, что синтез этих белков при АДП носит протективный характер.

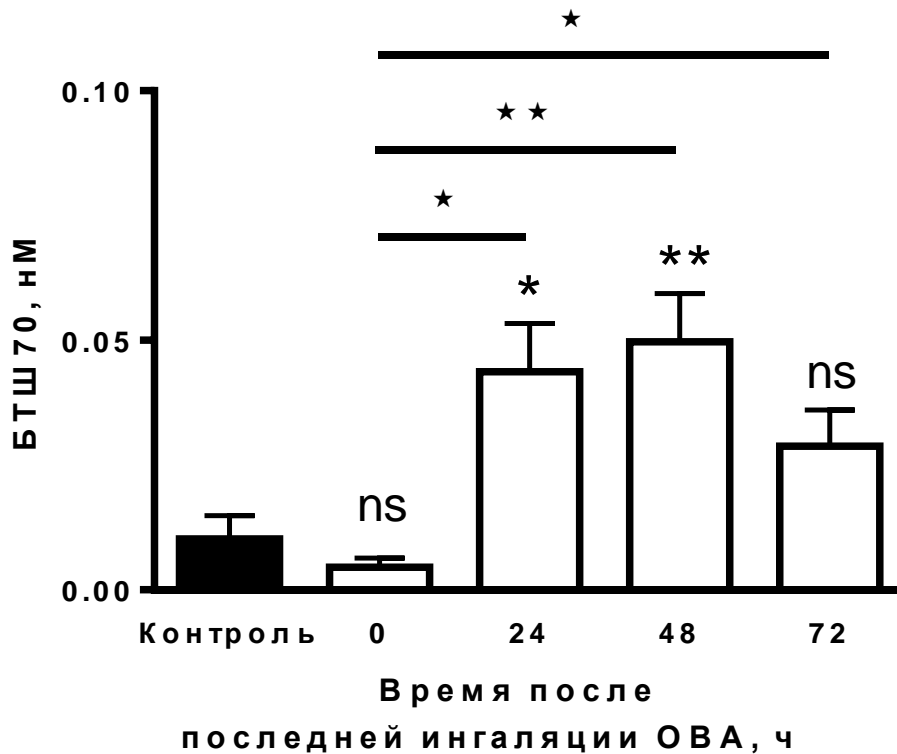


Рисунок 21. Динамика продукции внеклеточного БТШ70 в БАЛ в ответ на ингаляцию ОВА сенсibilизированным мышам. Представленные величины: средние значения \pm S.D., (5 мышей в группе). Значения, достоверно отличающиеся от значений, полученных для контрольной группы мышей: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; ns – отсутствие достоверного отличия. Значения, достоверно отличающиеся от значений, полученных для мышей непосредственно перед последним введением аллергена (время 0 ч) обозначено: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; ns – отсутствие достоверного отличия.

5.4. Изменение уровня внеклеточного АТФ при АВДП в условиях нормальной опорной нагрузки

Как было показано группой Idzko (Idzko M., Hammad H. et al., 2007), провокация аллергеном приводит к увеличению уровня внеклеточного АТФ. Нами были прослежены изменения уровня внеклеточного АТФ в БАЛ через 24, 48 и 72 часа после последней ингаляции аллергена при использовании краткосрочной модели АВДП. Как и ожидалось, пик секреции АТФ приходился на 24 часа, то есть на острую фазу АВДП (Рис. 22). В эффекторной фазе и позже (через 72 часа) наблюдалось снижение уровня внеклеточного АТФ (Рис. 22).

Таким образом, в данной работе было показано, что АТФ является маркером острой фазы АДП.

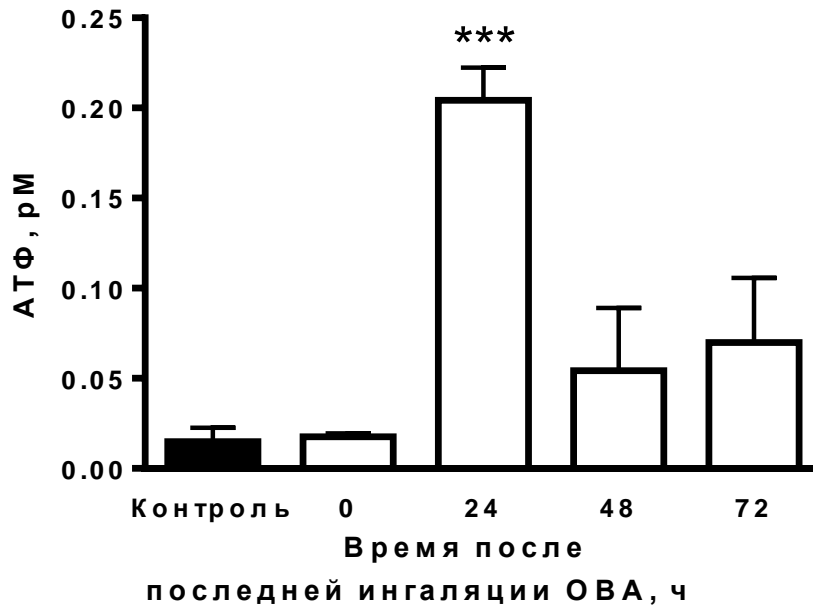


Рисунок 22. Динамика уровня АТФ в бронхоальвеолярных смывах мышей с АДП. Представленные величины: средние значения \pm S.D., (5 мышей в группе). Достоверное превышение уровня АТФ, обнаруженного в БАЛ сенсibilизированных мышей, не получавших ингаляции ОВА (время 0), обозначали *** $p \leq 0.001$.

5.5. 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. 1).

Таблица 1. 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 представлены в виде средних значений \pm S.D.; значения, достоверно отличающиеся от значений, полученных до ингаляции (время 0 ч) * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

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

5.6. Исследование иммуногенности и аллергических свойств экзогенно вводимого БТШ70, выделенного из сингенного организма

Известно, что в ряде случаев БТШ70 приписывают иммуногенную активность (Asea A., Kraeft S.K. et al., 2000, Quintana F.J. Cohen I.R., 2005). В связи с этим мы провели предварительную оценку возможных побочных эффектов препаратов БТШ70 в мышинной модели.

5.6.1. Индукция гуморального иммунного ответа на экзогенно вводимый БТШ70, выделенный из сингенного организма

С целью проверить, не вызывает ли экзогенно вводимый аутологичный БТШ70 побочных реакций, связанных с активацией иммунной системы, мышам проводили ежедневные инъекции БТШ70 в течение 7 недель. Уровень продукции общего БТШ70-специфического IgG оценивали в сыворотке периферической крови на 3, 5 и 7 неделе после начала иммунизации. В качестве положительного контроля мышам вводили релевантный белок БСА, обладающий сходной с БТШ70 молекулярной массой 70 кДа (Рис. 23).

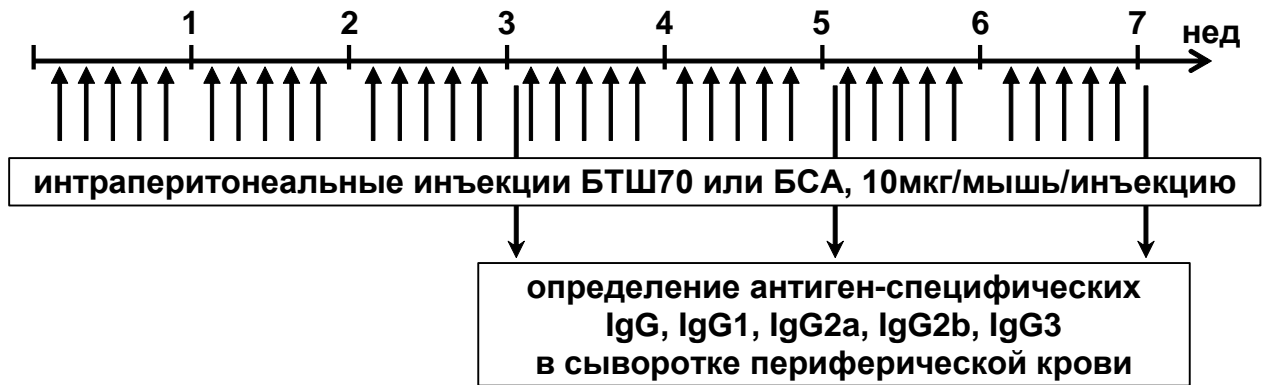


Рисунок 23. Схема длительного введения аутологичного БТШ70 мышам с целью оценки иммуногенности (в условиях нормальной опорной нагрузки). Мышам вводили БТШ70 или БСА 5 раз в неделю в дозе 10 мкг/мышь/инъекцию в течение 7 недель; отбор крови осуществляли на 3, 5 и 7 неделе. Количество мышей в каждой группе n=7.

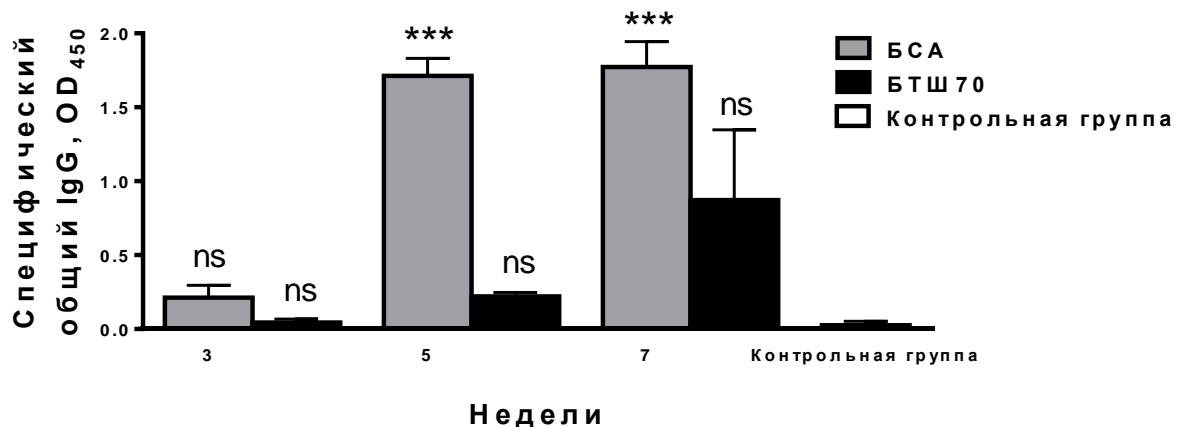


Рисунок 24. Системная секреция иммуноглобулинов в ответ на введение аутологичного БТШ70. Уровень общего специфического IgG антител в периферической крови мышей, получавших курс ежедневных внутрибрюшинных иммунизаций БСА или БТШ70 в течение 3, 5 и 7 недель. Разведение сывороток составляло 1:2000. Представленные величины: средние значения \pm S.D., полученные в 2-х экспериментах: 3 и 4 мыши в группе. Статистические значения обозначали: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns – отсутствие достоверных различий.

Было показано, что в отличие от БСА БТШ70, выделенный из внутренних органов сингенных мышей, не способен вызвать продукцию специфических IgG даже при длительной иммунизации (Рис. 24).

Незначительное увеличение концентрации анти-БТШ70 антител было обусловлено синтезом антител субкласса IgG1 (Рис. 25 А, Б, В).

Таким образом, было показано, что при длительной иммунизации аутологичный 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.

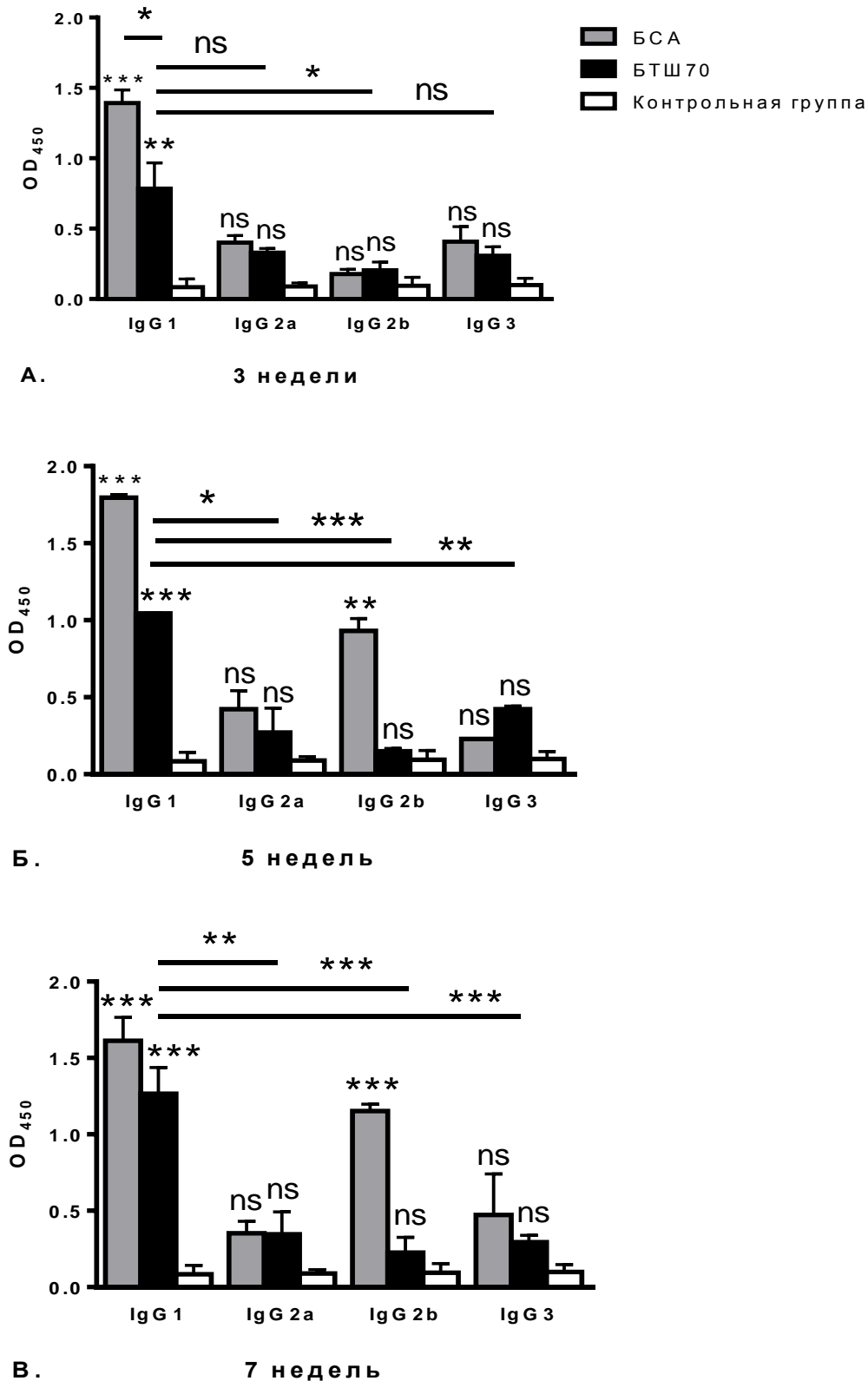


Рисунок 25. Системная секреция иммуноглобулинов в ответ на введение аутологичного БТШ70. Уровень подклассов IgG в периферической крови мышей, получавших курс ежедневных внутрибрюшинных иммунизаций БСА или БТШ70, на третьей (А), пятой (Б) и седьмой (В) неделе иммунизации. Разведение сывороток для

определения IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 составляло 1:200. Представленные величины: средние значения \pm S.D., полученные в 2-х экспериментах: 3 и 4 мыши в группе. Статистические значения обозначали: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns – отсутствие достоверных отличий.

5.6.2. Аутологичный БТШ70 не способен вызвать АДП

Поскольку, как описано выше (см. главу «Обзор литературы», подглаву 3.4.4.1) белки семейства БТШ70 обладают высокой гомологией, и среди белков, относящихся к данному семейству, выявлено более 5 белков-аллергенов, нами был проведен ряд экспериментов, направленных на выявление возможных аллергенных свойств аутологичного БТШ70. Используя стандартную модель индукции АДП (Рис. 26), мы провели оценку про-аллергенного эффекта БТШ70 на клеточный иммунный ответ.

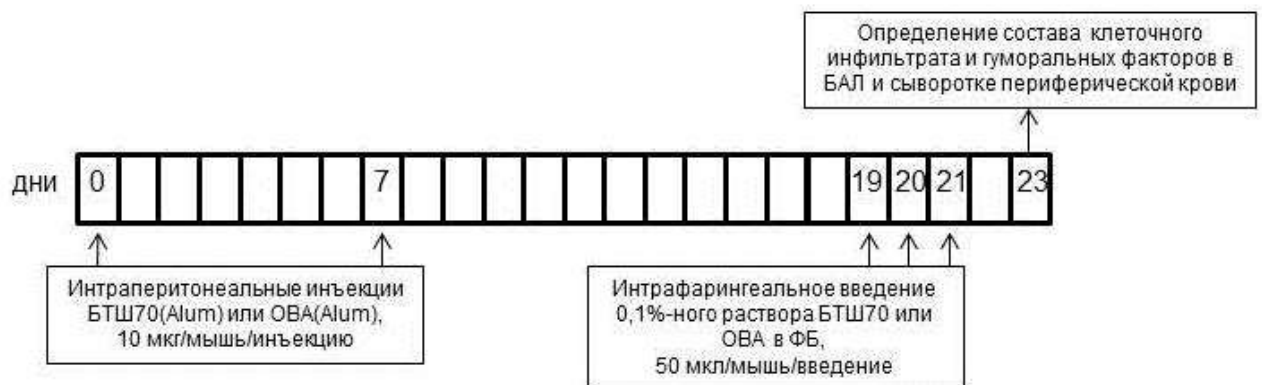


Рисунок 26. Схема индукции АДП с использованием БТШ70, выделенного из сингенных мышей. БТШ70 вводили мышам в смеси с адьювантом Imject Alum интраперитонеально на день 0 и 7; затем в виде 0,1% раствора интрафаренгиально на день 19, 20 и 21. Мышам из группы положительного контроля вводили ОВА по аналогичной схеме. БАЛ и сыворотка периферической крови мышей были получены через 48 часов после последней ингаляции соответствующим антигеном.

Показали, что в отличие от мышей, иммунизированных по сходной схеме ОВА, мыши, иммунизированные БТШ70, не проявляли признаков воспаления, а именно не наблюдалось увеличение общего количества клеток (Рис. 27) и эозинофилии дыхательных путей (Рис. 28).

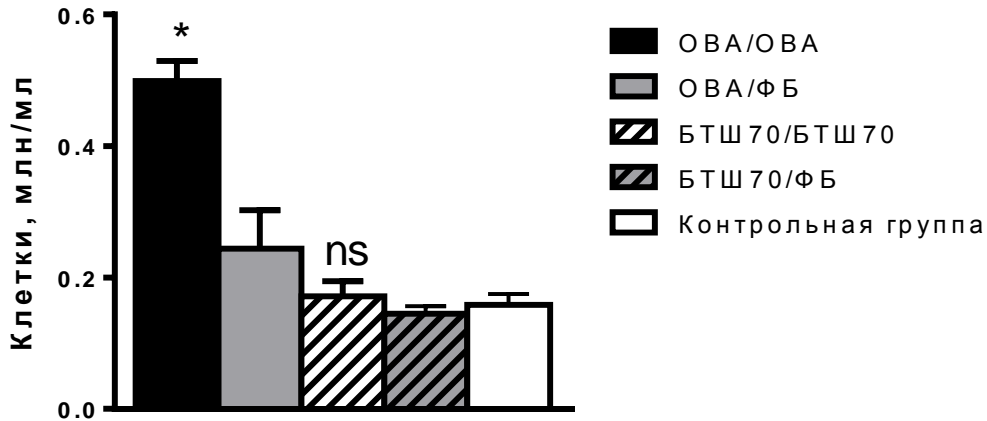


Рисунок 27. Влияние сенсibilизации и последующей ингаляции БТШ70 на общее количество клеток (млн/мл) в дыхательных путях мышей, получавших ОВА или БТШ70 по протоколу индукции АДП. Показатели были получены через 48 часов после последней ингаляции соответствующим антигеном. Результаты представлены как средние значения \pm S.D. (5 мышей в группе). Статистические значения обозначали: * $p \leq 0.05$; ns – отсутствие достоверных отличий.

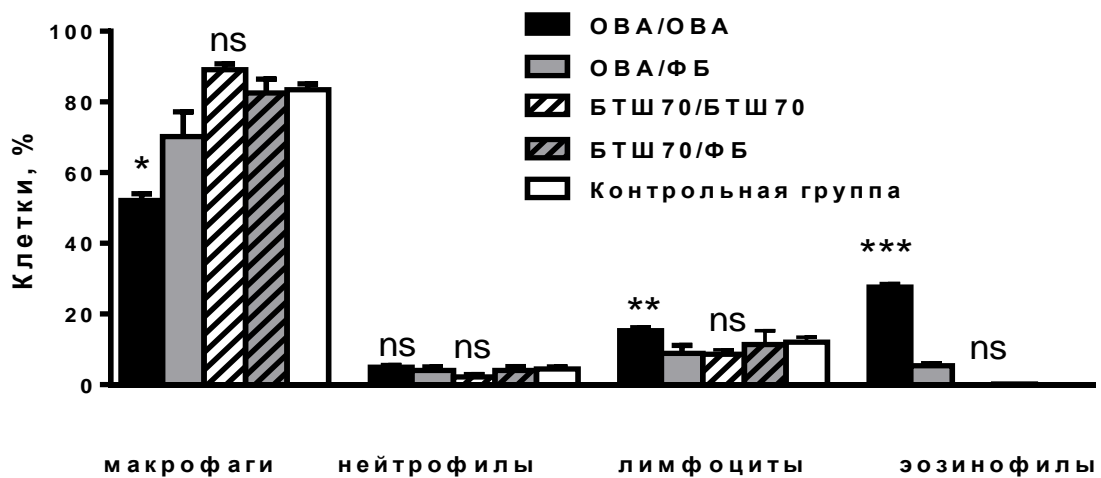


Рисунок 28. Влияние сенсibilизации и последующей ингаляции БТШ70 на дифференциальное количество клеток (%) в дыхательных путях мышей, получавших ОВА или БТШ70 по протоколу индукции АДП. Показатели были получены через 48 часов после последней ингаляции соответствующим антигеном. Результаты представлены как средние значения \pm S.D. (5 мышей в группе). Статистические значения обозначали: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns – отсутствие достоверных отличий.

Также было проведено исследование локального изменения гуморальных факторов, характерных для аллергического типа реагирования, при введении БТШ70 в соответствии со схемой индукции АДП. Анализ секреции проаллергических цитокинов не выявил достоверного повышения уровней IL-4, IL-5 и IL-13 в лаважной жидкости мышей при иммунизации БТШ70 по сравнению с контрольной группой мышей (Рис. 29).

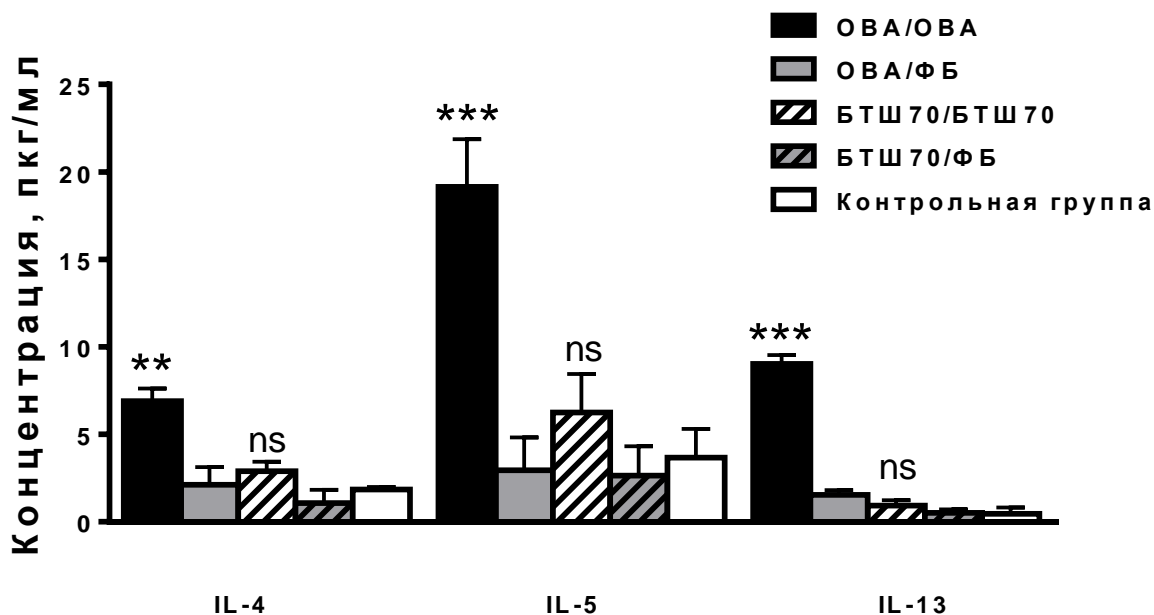


Рисунок 29. Локальное изменение уровня цитокинов в надосадочной жидкости БАЛ, характерных для аллергического типа реагирования, при введении БТШ70. Разведение лаважей 1:1. Результаты представлены как средние значения \pm S.D. (5 мышей в группе). Статистические значения обозначали: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns – отсутствие достоверных отличий.

Интересно отметить, что комбинированное введение БТШ70 оказывало влияние на изменение локального уровня IgA. Причем повышенный уровень БТШ70-специфического IgA в бронхоальвеолярных смывах наблюдался у мышей после внутрибрюшинного введения белка (Рис. 30) и возрастал после интрафаренгиальных введений (Рис. 30). Сходная динамика наблюдалась и в ответ на введение ОВА (Рис. 30).

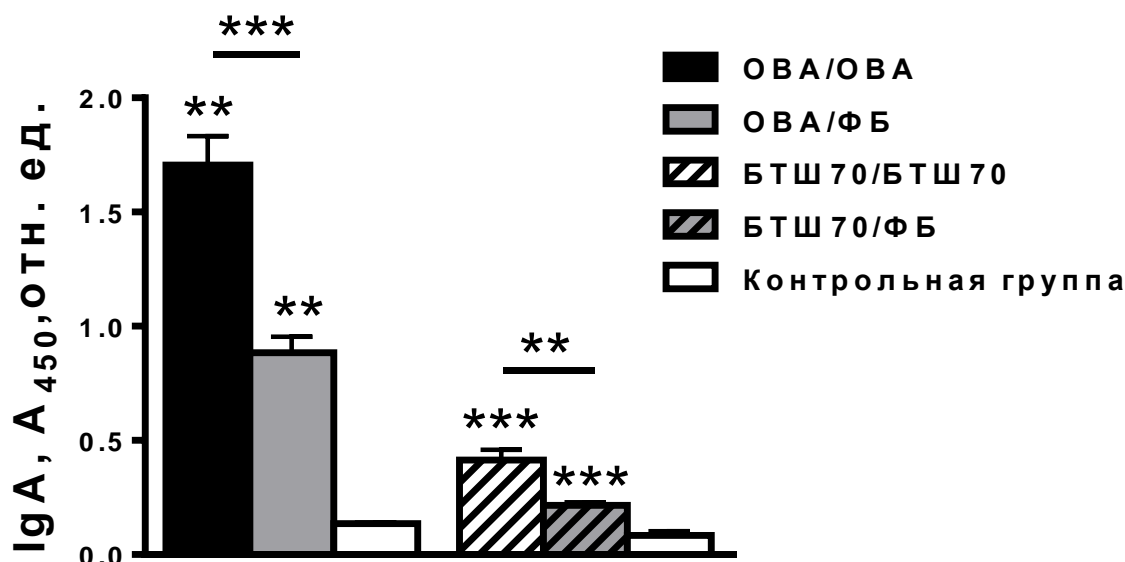


Рисунок 30. Локальное изменение IgA в надосадочной жидкости БАЛ мышей при индукции АДП с использованием ОВА и БТШ70 в качестве аллергенов. Разведение лаважей 1:1. Анализ образцов, взятых у мышей, получавших овальбумин или БТШ70 проводили на планшетах с иммобилизованными овальбумином и БТШ70 соответственно, образцы контрольной группы использовали и на планшетах с овальбумином, и на планшетах с БТШ70. Результаты представлены как средние значения \pm S.D. (5 мышей в группе). Статистические значения обозначали: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns – отсутствие достоверных отличий.

Введение экзогенного антигена белковой природы сопровождается образованием системного специфического IgG1, что и наблюдали у мышей, получавших инъекции и ингаляции ОВА (Рис. 31). Причем для повышения уровня антиген-специфического IgG1 в сыворотке периферической крови было достаточно двух внутрибрюшинных инъекций ОВА (Рис. 31). В тоже время введение БТШ70, выделенного из сингенного организма, в соответствии со схемой индукции АДП не приводило к повышению уровня специфического IgG1 по сравнению с преиммунными мышами (Рис. 31).

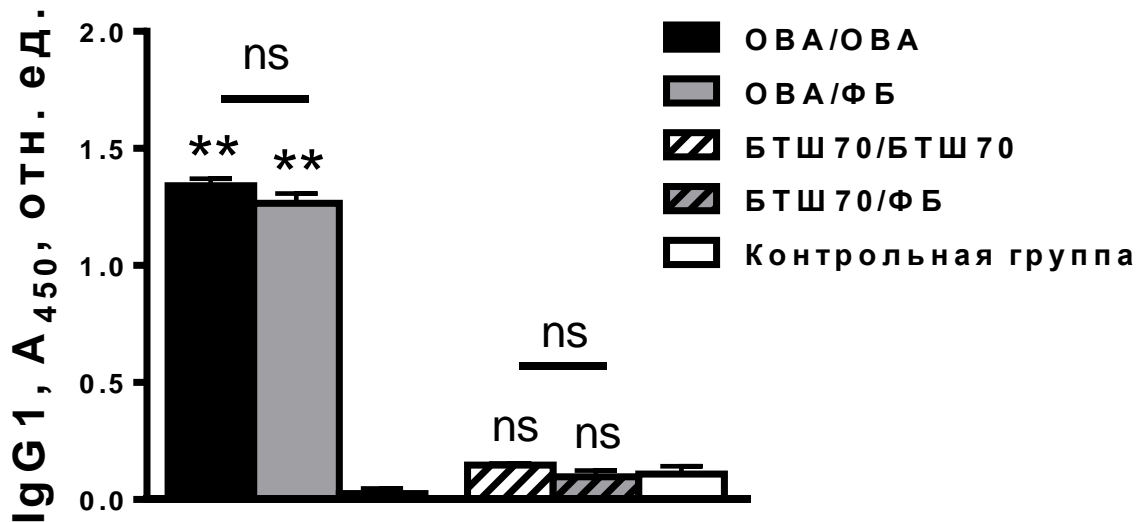


Рисунок 31. Локальное изменение IgG1 в сыворотке периферической крови мышей. Разведение сывороток 1:1000. Анализ образцов, взятых у мышей, получавших овалбумин или БТШ70, проводили на планшетах с иммобилизованными овалбумином и БТШ70 соответственно, образцы контрольной группы использовали и в том, и в другом случае. Результаты представлены как средние значения \pm S.D. (5 мышей в группе). Статистические значения обозначали: ** $p \leq 0.01$; ns – отсутствие достоверных отличий.

Одним из основных параметров, наблюдаемых при развитии АДП, является повышенный уровень аллерген-специфического IgE в сыворотке периферической крови. Повышение ОВА-специфического IgE наблюдалось у мышей с ОВА-индуцированным АДП, при этом ингаляции аллергена вызывали рост специфического IgE (Рис. 32). В случае БТШ70 IgE-опосредованный ответ не был сформирован ни после внутрибрюшинного введения антигена, ни после последующего интрафарингеального введения (Рис. 32).

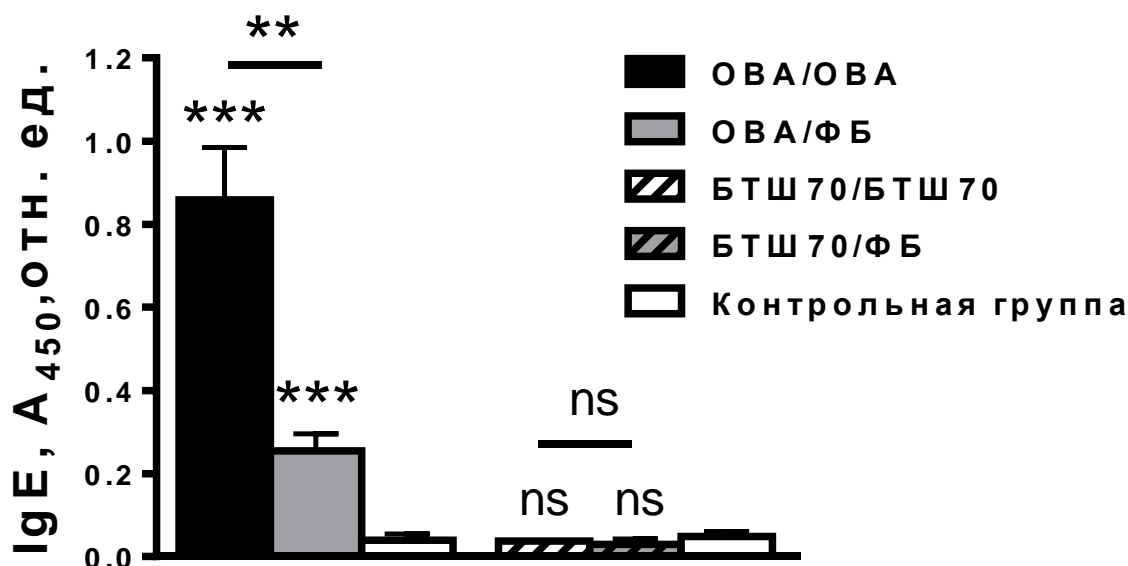


Рисунок 32. Локальное изменение IgG1 в сыворотке периферической крови мышей. Разведение сывороток 1:10. Анализ образцов, взятых у мышей, получавших овальбумин или БТШ70, проводили на планшетах с иммобилизированными овальбумином и БТШ70 соответственно, образцы контрольной группы использовали и в том, и в другом случае. Результаты представлены как средние значения \pm S.D. (5 мышей в группе). Статистические значения обозначали: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns – отсутствие достоверных отличий.

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

5.7. Влияние БТШ70 на развитие иммунного ответа в мышинной модели АВДП в условиях антиортостатического вывешивания

Было проведено исследование, направленное на изучение способности внеклеточной формы БТШ70 оказывать модулирующее влияние на процесс АВДП в условиях моделируемой гравитационной разгрузки. БТШ70, выделенный из внутренних органов мышей, вводили сингенным мышам в острой фазе индуцированного АВДП согласно схеме, приведенной на рис. 33, и проводили оценку изменения клеточного и гуморального иммунного ответа.

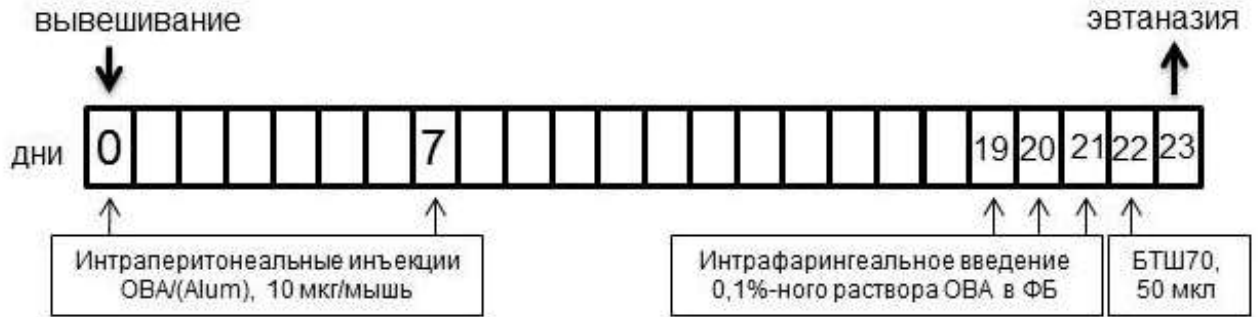


Рисунок 33. Схема модели АДП, комбинированной с моделью антиортостатического вывешивания. Цифрами указаны дни эксперимента от начала вывешивания. БТШ70 вводили мышам орофарингеально через 24 часа после последней ингаляции аллергена.

На момент окончания эксперимента отмечалось снижение массы мышей в группах с моделируемым АДП в условиях опорной разгрузки. По сравнению с группой мышей в условиях вывешивания, но без индукции АДП, изменения были не достоверны. Введение БТШ70 или денатурированного БТШ70 не влияло на выраженность изменения массы животных (Рис. 34).

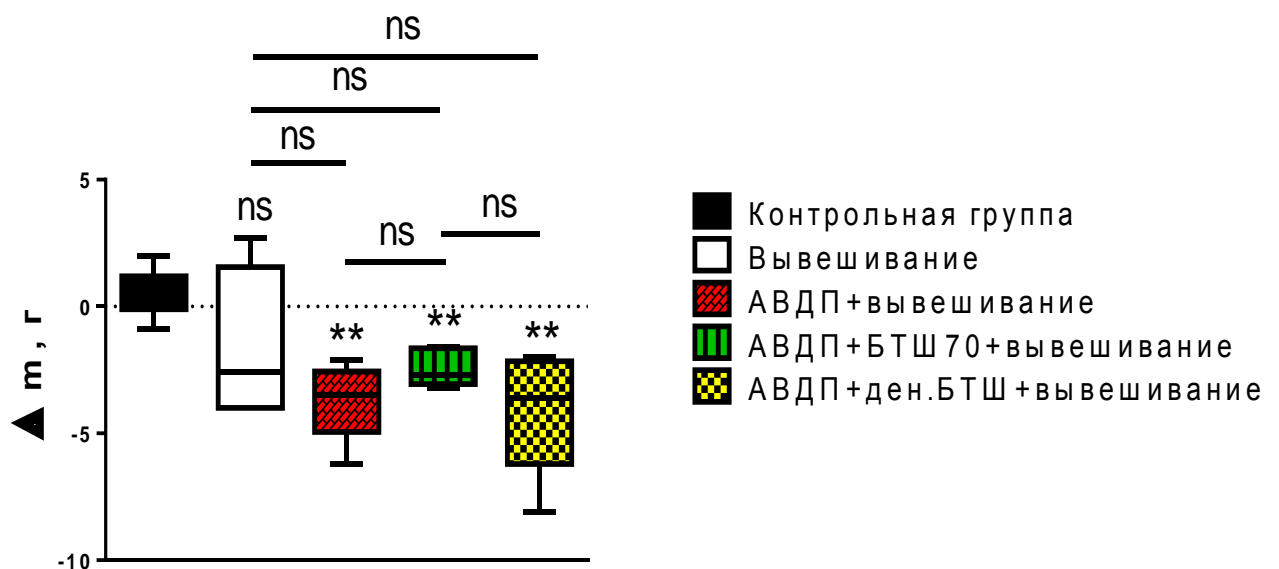


Рисунок 34. Изменение веса мышей на момент окончания эксперимента в исследуемых и контрольной группе ($n = 7$). Статистические значения обозначали: ** $p \leq 0.01$; ns – отсутствие достоверных отличий.

5.7.1. Влияние БТШ70 на локальный клеточный иммунный ответ

Вывешивание проводили на весь период эксперимента. БТШ70 вводили в острой фазе индуцированного аллергического воспаления. Полученные результаты продемонстрировали, что в условиях опорной разгрузки орофарингеальное 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 достоверно от контрольной группы мышей (Рис. 35 А). При введении денатурированного БТШ70 данный эффект отсутствовал (Рис. 35 А).

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. 35 Б), однако изменения были не достоверны. Данный факт свидетельствует в пользу того, что при АДП БТШ70 возможно оказывает супрессорное воздействие, так как известно, что нейтрофилы способны подавлять пролиферацию Th2 (Kusmartsev S.A., Li Y. et al., 2000).

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. Количество эозинофилов у этих мышей достоверно не отличалось от количества эозинофилов у мышей контрольной группы (Рис. 35 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.

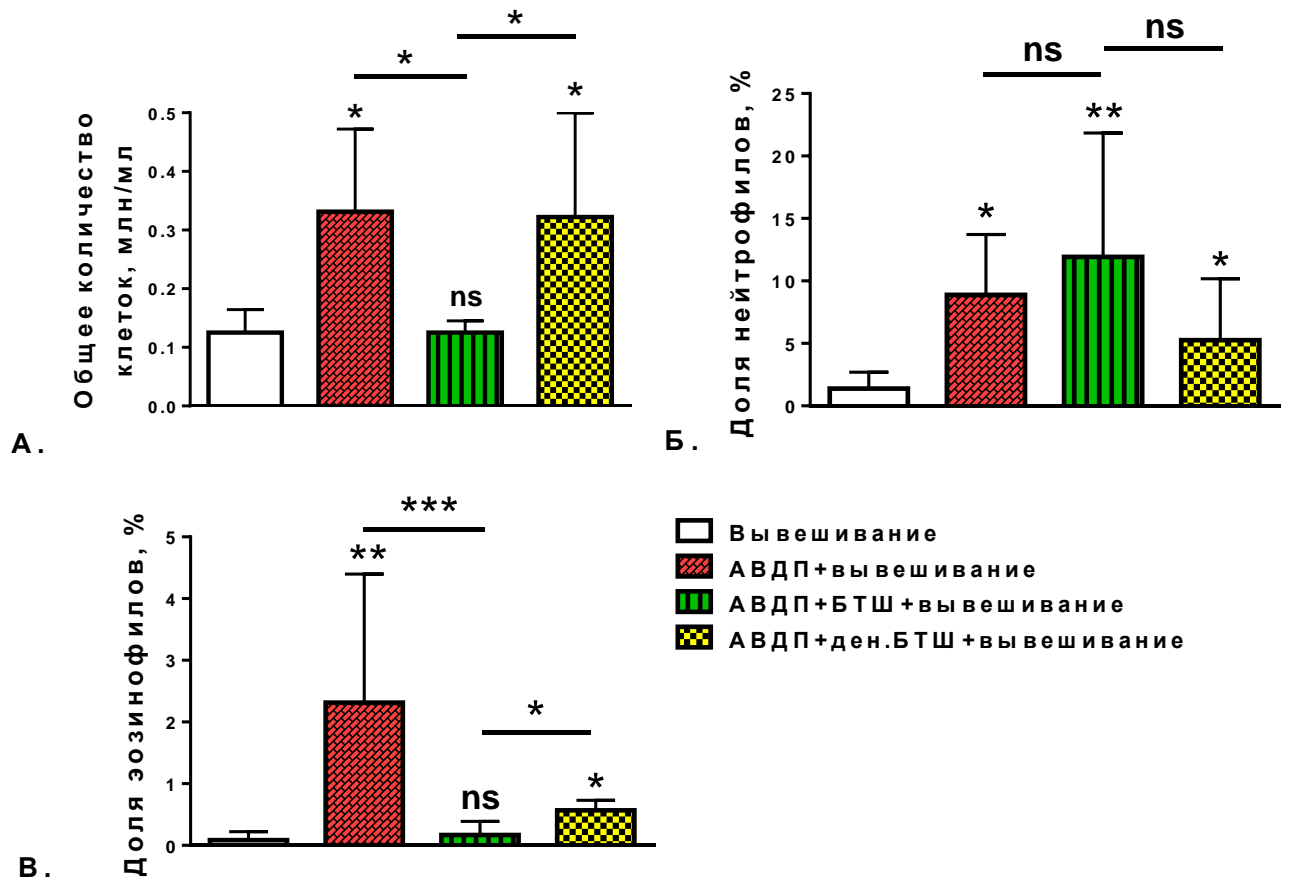


Рисунок 35. Влияние ингаляции БТШ70 в острой фазе АВДП на развитие воспалительного процесса в условиях антиорто статического вывешивания. (А) Общее количество клеток, (Б) доля нейтрофилов, (В) доля эозинофилов в БАЛ мышей. Приведены результаты измерений через 48ч после введения аллергена (через 24ч после введения БТШ70). Звезды над столбцами – сравнение с группой мышей с вывешиванием, сравнение исследуемых групп отмечено крышками (7 мышей в группе). Статистические значения обозначали: ** $p \leq 0.01$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns – отсутствие достоверных отличий.

5.7.2. Влияние БТШ70 на иммуноглобулин-опосредованный про-аллергический гуморальный ответ

Помимо анализа проаллергического клеточного ответа при введении БТШ70 в острой фазе АВДП, 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. 36).

Введение ОВА сопровождалось образованием системного ОВА-специфического IgG, что наблюдали у мышей, получавших инъекции и ингаляции ОВА (Рис. 36 А). В тоже время введение БТШ70 приводило к снижению уровня специфического IgG, при сравнении с контрольной группой изменения были недостоверны. При введении денатурированного БТШ70 уровень ОВА-специфического IgG достоверно повышался по сравнению с контрольной группой и не отличался от группы с АДП (Рис. 36 А).

Одним из основных параметров, характеризующих АДП, является повышенный уровень IgE в сыворотке периферической крови. Как было показано выше (Рис 14), индукция АДП у мышей под воздействием опорной разгрузки, как и в условиях нормальной нагрузки, вызывала 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 в модели АДП в условиях опорной разгрузки под действием БТШ70. Достоверное повышение ОВА-специфического IgE наблюдалось у мышей с АДП при вывешивании (Рис. 36 Б) 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 АДП (Рис. 36 Б). При введении денатурированного БТШ70 уровень продукции ОВА-специфического IgE не отличался от группы с АДП и было достоверно выше, чем при введении БТШ70 в острой фазе воспаления (Рис. 36 Б).

Как было показано выше (Рис. 30), при индукции АДП в условиях нормальной опорной нагрузки, отмечалось достоверное повышение уровня ОВА-специфического IgA. Таким образом, повышенный уровень IgA в надосадочной жидкости можно рассматривать как характеристику воспалительного процесса в дыхательных путях. В условиях вывешивания при индукции АДП 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. 36 А).

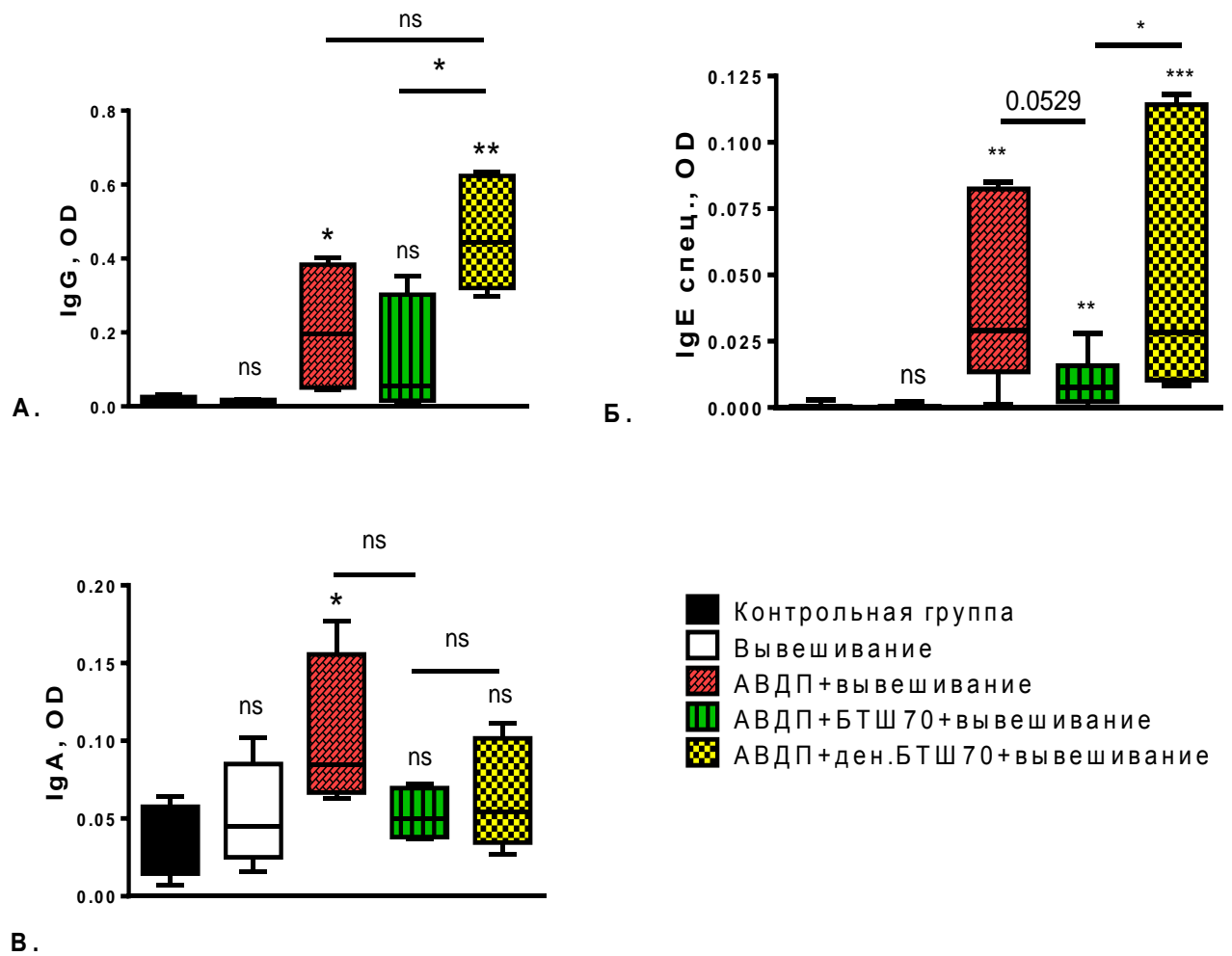


Рис. 36. Изменение гуморальных факторов, характерных для аллергического типа реагирования, при введении БТШ70/денатурированного БТШ70. Уровень ОВА-специфического IgG (А) и ОВА-специфического IgE (Б) в сыворотке периферической крови, а также уровни ОВА-специфического IgA в надосадочной жидкости БАЛ (В). Разведение лаважей 1:1, разведение сывороток для определения IgG1 1:1000, для определения IgE 1:10. Результаты представлены как средние значения оптической плотности \pm S.D. (7 мышей в группе). Статистические отличия: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns – не достоверно.

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

5.8. 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 аллергического воспаления способствовала тому, что уровень нейтрофилов в БАЛ сохранялся повышенным. С целью исследования действия экзогенного БТШ70 на миграцию нейтрофилов мы проанализировали изменение процентного содержания этих клеток в костном мозге в острой фазе развивающегося воспаления и через 48 часов после последней ингаляции аллергена. Полученные результаты 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 овальбумином интраперитонеально, но не получавшими ингаляций аллергена (Табл. 2). При этом локальное введение БТШ70 не изменяло количество и долю нейтрофилов в костном мозге по сравнению с группой с АДП (Табл. 2). Следовательно, БТШ70 не обладает регулирующим действием на процесс миграции нейтрофилов из костного мозга. Данное обстоятельство указывает на то, что повышенный уровень нейтрофилов в БАЛ мышей после введения БТШ70, в том числе в случае АДП в условиях вывешивания (Рис. 35), по-видимому, не связан с притоком новых нейтрофилов в очаг воспаления. Это свидетельствует в пользу предположения о том, что внеклеточный пул БТШ70, обладающий протективными свойствами (De Maio A., 2011), способен поддерживать выживаемость нейтрофилов, мигрировавших в дыхательные пути ранее.

Таблица 2. Доля нейтрофилов среди клеток костного мозга мышей в различных стадиях АДП: в острую фазу АДП (через 24 ч после последней ингаляции аллергена) и в эффекторную фазу АДП (через 48 ч после последней ингаляции аллергена).

	24 часа	48 часов
ОВА/ФБ	84,6 ± 8,1 (***)	80,4 ± 2,1 (***)
АВДП	57,3 ± 9,9 (ns)	55,9 ± 10,3 (ns)
АВДП + 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.

Приведены средние значения ± S.D. Статистические отличия: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns – отсутствие достоверных отличий.

С целью проверки такого предположения мы провели в первичной культуре нейтрофилов костного мозга мыши, полученных путем негативной селекции при помощи магнитной сепарации (Рис. 37 А, Б), оценку протективного эффекта препаратов БТШ70.

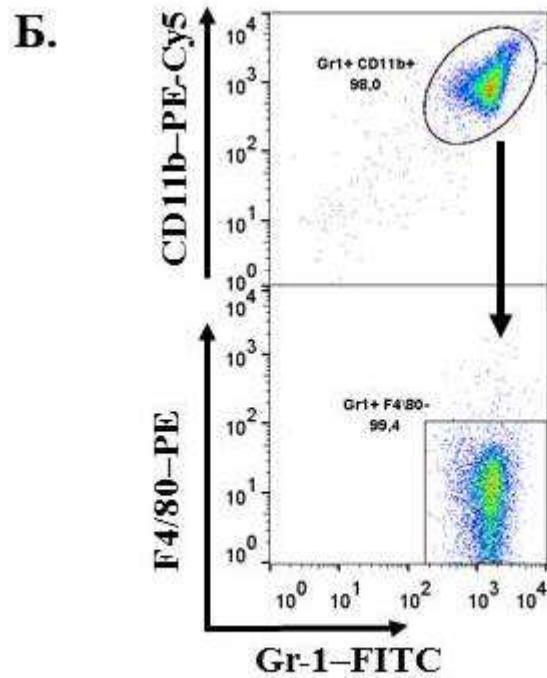


Рисунок 37. (А) Клетки костного мозга (левый плот) и нейтрофилы, выделенные из клеток костного мозга методом негативной селекции при помощи магнитной сепарации (правый плот). (Б) Цитометрический анализ гомогенности популяции нейтрофилов, выделенных из клеток костного мозга. Нейтрофилы идентифицировали как Gr-1⁺, CD11b⁺ (верхний плот) и Gr-1⁺ F4/80⁻ (нижний плот) клетки.

Было показано, что активированные РМА нейтрофилы способны погибать как апоптозом, так и нетозом и некрозом (Рис. 38).

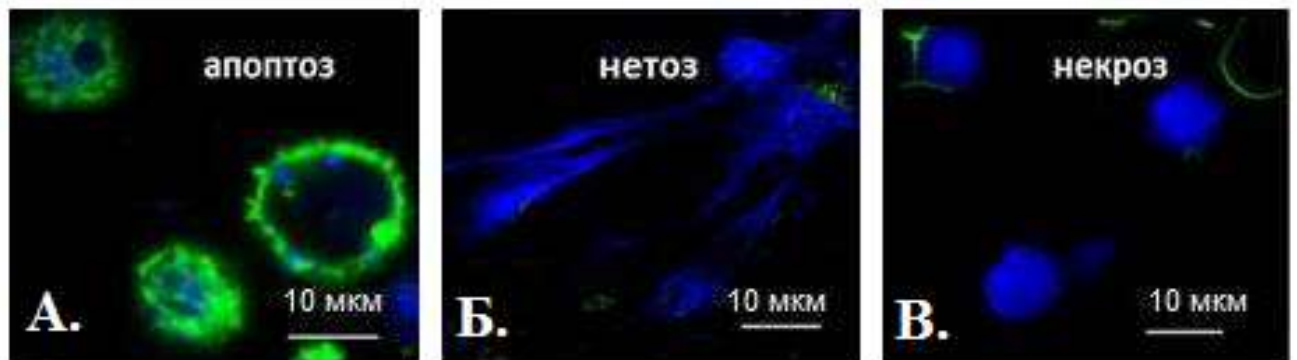


Рисунок 38. Визуализация клеточной гибели РМА-активированных нейтрофилов посредством: (А) апоптоза, (Б) нетоза и (В) некроза, полученная методом конфокальной микроскопии, масштаб 10 мкм, окраска Hoechst33342 (хроматин, синий), ActinGreen (актин, зеленый).

Далее с использованием модели РМА-индуцированной гиперактивации нейтрофилов и флуоресцентного нуклеотид-связывающего красителя SYTOX-Green была зарегистрирована способность БТШ70 достоверно снижать уровень внеклеточных нуклеотидов (Рис. 39), т.е. препятствовать процессам некроза и нетоза нейтрофилов. Необходимо отметить, что денатурированный БТШ70 утрачивал вышеописанную способность (Рис. 39).

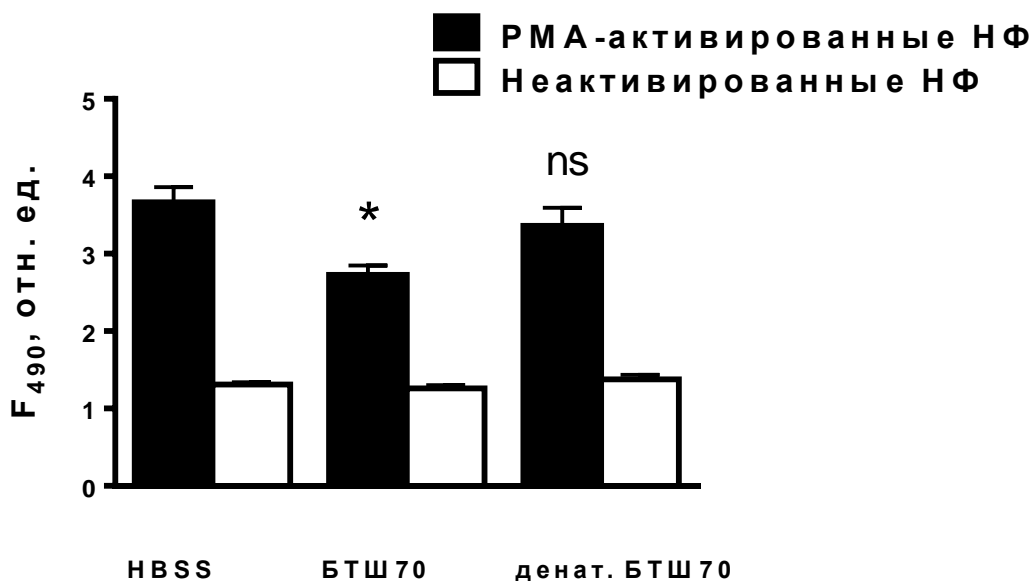


Рисунок 39. Влияние БТШ70 и денатурированного БТШ70 (денат. БТШ70) на уровень внеклеточных нуклеотидов в культуре РМА-активированных и неактивированных нейтрофилов костного мозга мыши после 4-часовой инкубации. Статистические различия, полученные для клеток, инкубированных с HBSS, обозначены: * $p \leq 0.05$; ns – отсутствие достоверных отличий.

Вышеприведенные данные позволяют предположить, что повышенный уровень нейтрофилов, наблюдаемый в БАЛ мышей, получавших БТШ70, частично обусловлен тем фактом, что нейтрофилы не погибали по механизму нетоза или некроза. При этом следует отметить, что регистрируемые при анализе цитоспинов нейтрофилы БАЛ сохраняли нормальную морфологию (Рис. 12, Рис. 35).

Для того чтобы сделать предположение о дальнейшей судьбе нейтрофилов в дыхательных путях при аллергическом воспалении, была проведена серия экспериментов, направленная на оценку влияния БТШ70 на апоптоз нейтрофилов. Нейтрофилы, выделенные из клеток костного мозга мыши, культивировали в течение 20 часов в среде RPMI с 10% телячьей сывороткой при 5% CO₂ и +37°C. На диаграмме переднего малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния были определены клетки с «нормальной» (неизменной) морфологией (Рис. 40 А). Среди этих клеток был определен процент клеток, связывающих Annexin V (Рис. 40 Б), то есть находящихся в процессе программированной гибели. Для выявления

способности БТШ70 усиливать спонтанный апоптоз нейтрофилов исследовались возрастающие концентрации БТШ70 (1 мкМ и 10 мкМ), в качестве положительного контроля использовался активатор апоптоза стауроспорин, в качестве негативного контроля – денатурированный БТШ70. Полученные результаты продемонстрировали способность экзогенного БТШ70 дозозависимо усиливать спонтанный апоптоз в культуре нейтрофилов (Рис. 40 В). При этом, как и в случае препятствия некрозу/нетозу, денатурированный БТШ70 не обладал подобной активностью (Рис. 40 В).

Приведенные данные косвенно свидетельствуют в пользу того, что одним из механизмов противоаллергического действия БТШ70 в модели АДП является подавление гиперактивации нейтрофилов, приводящей к их гибели, формированию NET и усилению воспаления (Dworski R., Simon H.U. et al., 2011, Kobayashi Y., 2015, Lu T., Kobayashi S.D. et al.).

Таким образом, внеклеточный БТШ70, увеличивая выживаемость короткоживущих клеток за счет подавления процессов нетоза и некроза в популяции периферических нейтрофилов, приток которых в дыхательные пути был вызван ингаляциями аллергена (Mosca T., Menezes M.C. et al., 2015), обуславливает гибель нейтрофилов в очаге воспаления по программе апоптоза, что ускоряет завершение воспалительного процесса (Fox S., Leitch A.E. et al., 2010).

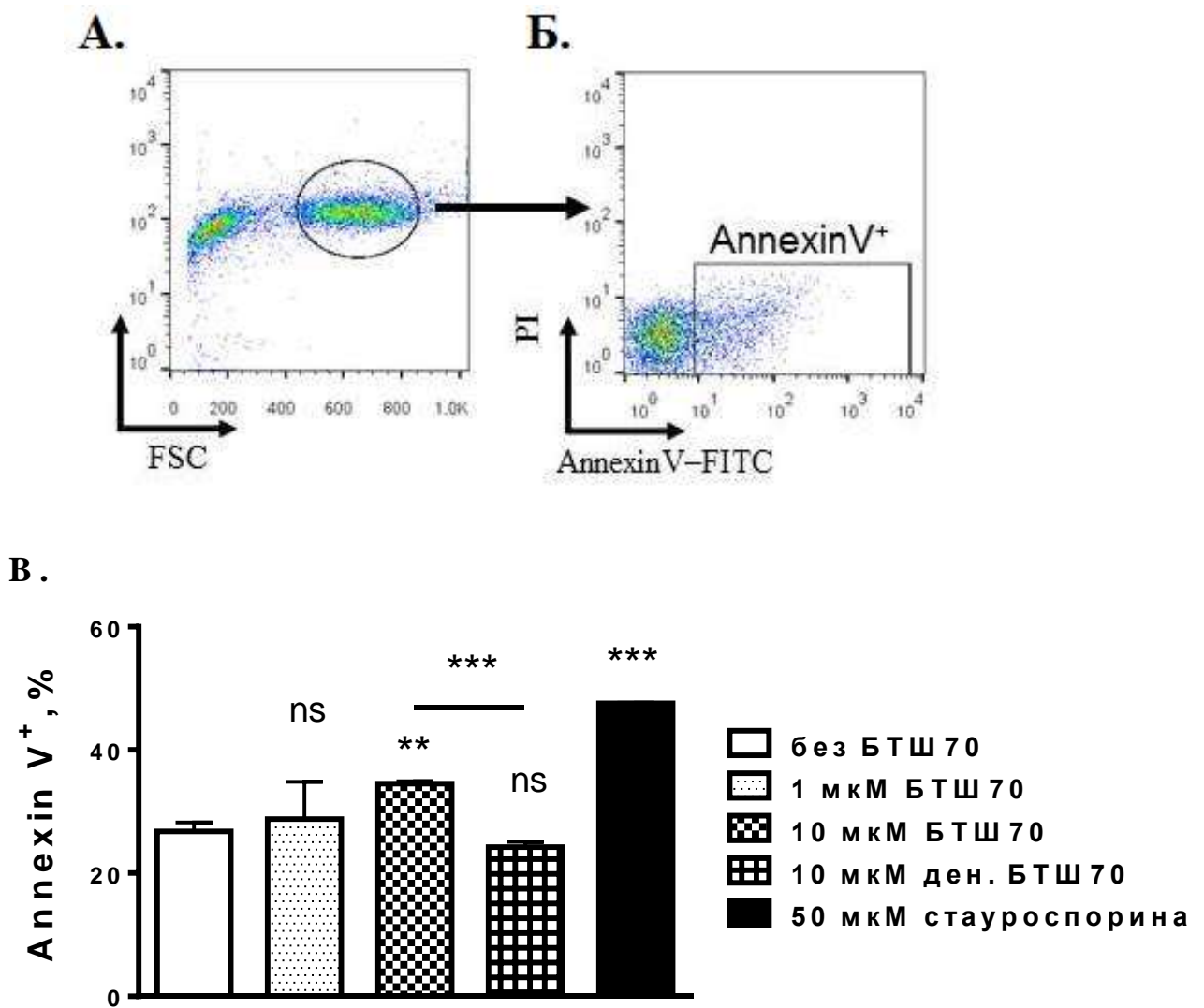


Рисунок 40. Оценка влияния БТШ70 на миграцию и тип клеточной гибели нейтрофилов костного мозга. (А) 20-часовая инкубация нейтрофилов приводит к разделению клеток на популяции с нормальной (регион выделен эллипсом) и измененной морфологией. (Б) Спонтанный апоптоз выделенных нейтрофилов определяли по связыванию AnnexinV-FITC клетками с неизменной морфологией (регион AnnexinV⁺). (В) 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. Статистические отличия от значений, полученных для группы без добавления БТШ70, обозначали: ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001; ns – отсутствие достоверных отличий.

5.9. Влияние БТШ70 на АТФ-индуцированный хемотаксис ДК

Хорошо известно, что помимо шаперонной активности, БТШ70 обладает АТФ-азной активностью (см. главу «Обзор литературы», подглаву 3.4.2). С целью подтвердить гипотезу о том, что одним из механизмов протективного действия БТШ70 при АВДП является прямое взаимодействие с внеклеточным АТФ, нами было исследовано влияние БТШ70 на хемотаксическую активность АТФ. Исследование проводили 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. Реагенты использовали в концентрации 1×10^{-6} М.

Показали, что наиболее выраженным хемотаксическим эффектом при равных концентрациях, как и предполагалось, обладал АТФ (Рис. 41). БТШ70 также обладал способностью вызывать миграцию ДК, однако индекс хемотаксической активности при используемой концентрации был значительно ниже, чем в случае АТФ (Рис. 41). В концентрации 1×10^{-6} М хемотаксическая активность АДФ была значительно ниже активности БТШ70 (Рис. 41). 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. 41).

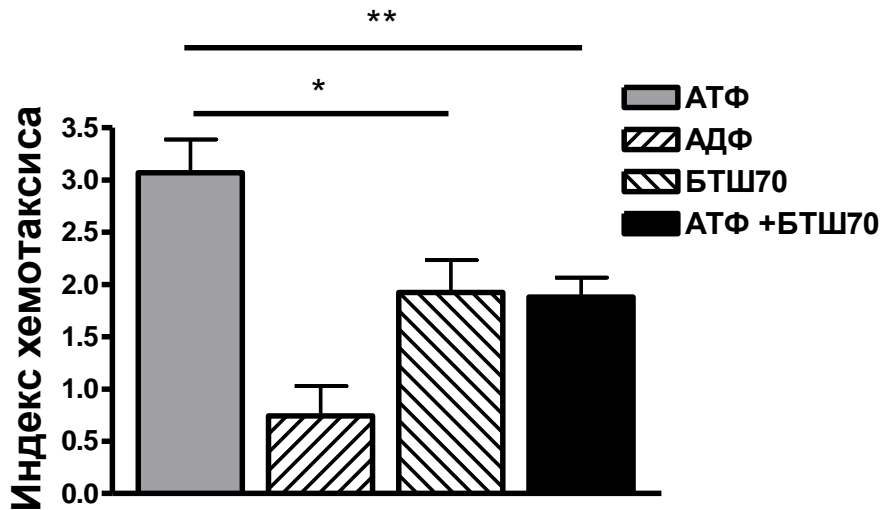


Рисунок 41. Влияние БТШ70 на АТФ-индуцированный хемотаксис ДК. Миграция ДК, выращенных из костномозговых предшественников в ответ на следующие стимулы: АТФ, АДФ, БТШ70 и АТФ в присутствии БТШ70 в соотношении 1:1. Все аттрактанты взяты в концентрации 1×10^{-6} М. Результаты показаны в виде средних значений \pm S.D. Для каждого из хемоаттрактантов было проведено 3 независимых эксперимента. Статистические значения обозначены: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

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

5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе была разработана модель АВДП, совмещенного с моделью антиортостатического вывешивания. При подборе модели было учтено следующее: 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 и совместимая с жизнью обструкция дыхательных путей, возникающие, в том числе, вследствие массового притока лейкоцитов в дыхательные пути (Lemanske R.F., Jr. Busse W.W., 2003). 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 антиортостатического вывешивания.

Исследования кинетики изменений характерных для АВДП показателей выявили его двухфазное развитие, наблюдавшееся 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. Наиболее охарактеризованной в мировой практике является модель АВДП с использованием овальбумина. Описано несколько отличающихся по длительности схем введения аллергена, позволяющих получить необходимые проявления АВДП. В данной работе за основу была выбрана модель, описанная Idzko и соавт. (Idzko M., Hammad H. et al., 2007), на основе которой была

разработана краткосрочная модель АВДП. Ранее отмечалось, что длительное вывешивание приводило к физиологическим изменениям у животных, поэтому сокращение длительности модели АВДП было для нас особенно актуальным. Сравнение длительной и краткосрочной моделей, проведенное в настоящей работе, показало, что проявления АВДП хоть и менее выражены, но вполне детектируемы при использовании краткосрочной модели. Таким образом, для комбинирования с моделью опорной разгрузки была выбрана краткосрочная модель АВДП, позволяющая провести вывешивание на весь срок. Поскольку ранее Jang T.Y. и соавт (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015) показали, что при использовании модели АВДП совместно с антиортостатическим вывешиванием количество клеток в БАЛ было ниже, чем у мышей в условиях нормальной нагрузки, то для того, чтобы в БАЛ было достаточно клеток и была возможность оценить наличие и интенсивность воспаления в легких, было принято решение использовать модель с применением OVA grade V.

В ходе исследования не отмечалось значимого изменения массы животных как контрольной, так и группы с вывешиванием, что соответствует данным, полученным Gaignier et al. (Gaignier F., Schenten V. et al., 2014), которые не выявили различий в весе мышей между исследуемыми и контрольными группами в ходе 21-суточного вывешивания. Также этими авторами не было выявлено изменений между нормализованными к весу мышей массами селезенки, что соответствует и нашим данным. Однако, Jang et al. (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015) при анализе изменения веса мышей с АВДП в условиях опорной разгрузки отмечали значительно большую потерю веса после 2-недельного вывешивания по сравнению с группой мышей с АВДП в условиях нормальной нагрузки, а также с контрольными группами. Авторы объясняют полученные результаты развитием кахексии у животных на фоне АВДП, которая усугубляется пребыванием в условиях пролонгированной опорной разгрузки. В нашем исследовании также отмечалось снижение веса мышей с АВДП в условиях вывешивания по сравнению с контрольной группой, в то же время по сравнению с группой, находящейся в условиях антиортостатической разгрузки без индукции АВДП, изменения были недостоверны. Вероятная причина снижения массы тела заключается, видимо, в дополнительном стрессе от введения препаратов или применения наркоза при введении препаратов. Также причиной может быть короткий промежуток времени (24 часа) от последнего введения препарата до эвтаназии, за

который мыши не успевали компенсировать дефицит веса. Введение БТШ70 или денатурированного БТШ70 не вызывало изменений потери массы по сравнению с мышами с АВДП.

Проведенное в рамках данной работы сравнение параметров клеточного ответа на индукцию АВДП показало, что происходит снижение притока провоспалительных клеток в БАЛ, а также менее выражена эозинофилия при вывешивании по сравнению с АВДП в условиях нормальной нагрузки. Полученные результаты коррелируют с результатами Jang T.Y. и соавт. (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015), в их работе также было показано снижение общего количества клеток в БАЛ по сравнению с контрольной группой. При дифференцированном анализе клеточного состава БАЛ в нашей модели отмечалось уменьшение доли эозинофилов и увеличение доли нейтрофилов при индукции АВДП в условиях опорной разгрузки по сравнению с нормальной опорной нагрузкой. Полученные результаты хорошо коррелируют с данными, описанными Jang et al. (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015).

Spielmann G. et al. (Spielmann G., Agha N.H. et al., 2019) показали, что длительное пребывание в условиях КП не оказывало влияние на В-клеточное звено иммунного ответа, а именно на количество и долю В-клеток, а также на выработку IgG и IgM антител. При этом уровень IgA в плазме крови был несколько повышен во время полета, хотя изменения были недостоверны. В данной работе, при моделировании условий КП на мышах было показано, что вывешивание не оказывало значительного влияния на системный иммуноглобулин-опосредованный ответ. Так в группах с АВДП с вывешиванием и без вывешивания отличий в продукции общего IgE практически не наблюдалось. При этом, уровень общего IgE при индукции АВДП в условиях опорной разгрузки достоверно превышал этот показатель у контрольной группы, кроме того, отмечалось значительное увеличение титров аллерген-специфического IgE, что коррелировало с данными Jang et al. (Jang T.Y., Neo M.J. et al., 2015), и IgG. Таким образом, в настоящей работе показали, что при индукции АВДП в условиях моделируемых факторов КП происходит интенсификация гуморального ответа, что может являться мишенью для терапевтического воздействия БТШ70.

Проведенный в данной работе анализ цитокин-опосредованного ответа подтвердил проаллергический характер воспаления: отмечалось увеличение

количества провоспалительных цитокинов IL-4, IL-5, IL-6 в БАЛ мышей с индуцированным АДП в условиях вывешивания. При этом в сыворотке периферической крови наблюдалось снижение секреции IFN- γ и увеличение концентрации IL-5. Таким образом, моделируемая микрогравитация при длительном антиортостатическом вывешивании усугубляет тяжесть клинического течения аллергического заболевания.

Полученные нами результаты свидетельствуют в пользу 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 космической миссии.

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 и без того 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.

По различным литературным данным внеклеточный пул БТШ70 обладает иммуномодулирующими свойствами (Prado N., Marazuela E.G. et al., 2008, Fujibayashi T., Hashimoto N. et al., 2009, Shin Y.S., Takeda K. et al., 2009, Tanaka K., Tanaka Y. et al., 2010, Cramer R., 2012). Было показано, что повышение уровня внеклеточного БТШ70 как в сыворотке периферической крови, так и локальное коррелировало с увеличением тяжести течения воспаления в дыхательных путях (Yang M., Wu T. et al., 2005, Cramer R., 2012). Используя модель АДП, мы показали, что несмотря на повышение уровня внеклеточного БТШ70 в дыхательных путях в острой фазе воспаления, соотношение концентрации БТШ:АТФ было значительно ниже, чем на стадии разрешения воспаления и у контрольной группы мышей. Таким образом, 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 этом отмечалось снижение общего притока провоспалительных клеток в легкие, уменьшение доли эозинофилов по сравнению с мышами, не получавшими БТШ70. Кроме того, супрессивное воздействие проявлялось в виде увеличения количества нейтрофилов через 48 часов после введения БТШ70, так как известно, что нейтрофилы способны подавлять активацию и пролиферацию Th2 (Kusmartsev S.A., Li Y. et al., 2000). Помимо этого наблюдалась модификация гуморального ответа, проявлявшаяся в виде снижения уровней IL-4, IL-13, мишенью которых являются эпителиальные клетки, и IL-5, воздействующего непосредственно на эозинофилы, а также снижением экспрессии аллергенспецифического IgA в надосадочной жидкости БАЛ (Троянова Н.И., Постовская А.М. и др., 2015). 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 H. 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 данные об изменении уровня нейтрофилов в БАЛ при индукции АДП (Рис. 13 Б, 35 Б) и уровня внеклеточного АТФ в лаважной жидкости (Рис. 22), можно сделать предположение о связи между массовой гибелью нейтрофилов и выбросом АТФ во внеклеточное пространство дыхательных путей. Данное предположение согласуется с полученными ранее данными о способности нейтрофилов секретировать АТФ при активации различными внешними стимулами как

бактериальной природы, так и гуморальными компонентами иммунитета (Chen Y., Yao Y. et al., 2010). Значительное повышение уровня внеклеточного АТФ, являющегося триггером воспаления, наблюдается в бронхоальвеолярных смывах сенсibilизированных пациентов и экспериментальных животных после ингаляции аллергена. 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 H. et al., 2007). Как было описано ранее, концентрация АТФ во внеклеточном пространстве поддерживается на постоянном незначительном уровне эктоферментами E-NTPD, обладающими свойством гидролизовать АТФ и АДФ до АМФ (Yegutkin G.G., 2008, Deaglio S. Robson S.C., 2011). 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 настоящем исследовании, 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.

Поскольку E-NTPD локализованы в клеточной мембране, влиять на уровень экспрессии этих ферментов возможно только путем подбора специфического индуктора, в то время как концентрацию секреторного БТШ70 в острой фазе воспаления можно увеличить непосредственно ингаляцией раствора белка в дыхательные пути. Количественная оценка концентраций внеклеточных АТФ и БТШ70 позволила определить необходимую концентрацию БТШ70 для достижения соотношения 1:1.

Müller et al. (Muller T., Grimm M. et al., 2010) показали, что АТФ *in vitro* усиливает хемотаксис эозинофилов и ДК. В данной работе показали, что БТШ70 способен останавливать рекруитмент эозинофилов в дыхательные пути в ответ на введение аллергена. Полученные результаты дают возможность предположить, что связывание внеклеточного АТФ белком БТШ70 также оказывает влияние на хоминг

эозинофилов *in vivo*. С целью подтвердить предположение о том, что АТФ-азная активность БТШ70 является одной из причин протективного воздействия БТШ70 при АВДП, в данной работе было проведено исследование влияния БТШ70 на хемотаксическую активность АТФ. Активность АТФ как хемоаттрактанта по отношению к ДК была исследована *in vitro* при помощи миграционного теста (Idzko M., Dichmann S. et al., 2002, Muller T., Grimm M. et al., 2010, Gibbs S., Spiekstra S. et al., 2013). Способность АТФ и АДФ вызывать хемотаксис выделенных из периферической крови человека ДК была количественно охарактеризована в диапазоне концентраций от 1×10^{-11} до 1×10^{-2} , причем для достижения наибольшего индекса хемотаксиса концентрация АДФ должна была превышать концентрацию АТФ в 100 раз (Muller T., Grimm M. et al., 2010). Нами было проведено исследование способности БТШ70 ингибировать АТФ-направленный хемотаксис. 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. Способность БТШ70 вызывать хемотаксис была описана ранее с использованием нейтрофилов (Hinchado M.D., Giraldo E. et al., 2012), однако никогда ранее не была исследована по отношению к ДК. 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. Подобные результаты были получены ранее группой Idzko M. при нейтрализации АТФ в дыхательных путях (Idzko M., Hammad H. et al., 2007), 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 противовоспалительную активность БТШ70. Поскольку, как было описано выше, нейтрофилы острой фазы могут являться основным источником внеклеточной АТФ, нами было исследовано воздействие БТШ70 на нейтрофилы. Как было показано в работе, при ингаляции БТШ70 в острой фазе АВДП количество нейтрофилов в БАЛ

мышей не снижалось значительно и сохранялось через 48 часов после последней ингаляции аллергена. На основании этого, в данной работе было сделано предположение о том, что БТШ70 способен оказывать влияние на нейтрофилы. В экспериментах *in vitro* было показано, что БТШ70 способен подавлять активацию нейтрофилов периферической крови человека (Antonova O.Y., Yurinskaya M.M. et al., 2012). В данной работе мы продемонстрировали, что противоаллергическим действием БТШ70 в модели ОВА-индуцированного АДП является подавление гиперактивации нейтрофилов, приводящей к их гибели, формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек и усилению воспаления. Кроме того, БТШ70 способен увеличивать выживаемость нейтрофилов за счет подавления процессов некроза и некроза, обуславливая гибель нейтрофилов по программе апоптоза. Применительно к локальному воспалительному ответу при АДП такое воздействие способствует разрешению воспаления. Таким образом, 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.

Отличительной чертой данной работы является использование аутологичного белка БТШ70. С целью избежать нежелательной активации иммунной системы в ответ на примеси LPS, характерные для рекомбинантных белков, а также формирования клеточного и гуморального ответа на экзогенный антиген белковой природы, в данном исследовании был использован белок БТШ70, выделенный из внутренних органов мышей и последовательно очищенный с помощью аффинной хроматографии и диализа. Как было подтверждено в данной работе, полученный таким образом белок не обладал иммуногенностью и аллергенными свойствами при введении мышам.

Таким образом, в настоящем 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 шаперонных свойствах, проявляемых этим белком.

6. 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.

7. БЛАГОДАРНОСТИ

Эта работа была выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-34-01028/16 (получатель гранта Сервули Е.А.).

Выражаю благодарность заведующему лабораторией клеточных взаимодействий ИБХ РАН, профессору Сапожникову А.М. за предоставление лабораторной базы для проведения экспериментальных исследований информационную поддержку и рекомендации при написании литературного обзора. Также благодарю Болховитину Е.Л. за помощь в проведении оценки хемотаксиса дендритных клеток, Постовскую А.М. за помощь в постановке теста активации нейтрофилов, Ильинского Н.С. за помощь в анализе цитокинов методом проточной цитометрии, Калашникову О.А. за помощь в проведении иммуноферментного анализа для определения концентрации цитокинов, а также лабораторию биофизики клетки ГНЦ РФ-ИМБП РАН, в особенности заведующую лабораторией, профессора Огневу И.В. и Усик М.А. за помощь в осуществлении экспериментов с антиортостатическим вывешиванием.

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Газенко, О. Г., Григорьев, А. И., Наточин, Ю. В. Водно-солевой гомеостаз и космический полет. Проблемы космической биологии. Т. 54., М. Наука. – 1986. – С. 240.
2. Григорьев, А. И. Космическая биология и медицина. Орбитальная станция «Мир», Москва – 2001. – С. 660.
3. Григорьев, А. И., Потапов, А. Н. От полета Ю.А. Гагарина к современным пилотируемым космическим полетам и межпланетным космическим экспедициям. // Авиакосмическая и экологическая медицина – 2011. – Т. 45 – N. 2 – С. 3.
4. Зяблицин, А. В., Алекперов, Э. А., Бойко, А. А., Клинова, А. В., Троянова, Н. И., Сапожников, А. М. Анализ механизмов неклассического пути секреции БТШ70 в популяциях лимфоидных клеток. // Иммунология – 2012. – Т. 33 – N. 1 – С. 49-50.
5. Ильин, В. К., Воложин, А. И., Виха, Г. В. Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания. М.: Наука. – 2005. – С. 373.
6. Ильин, Е. А., Новиков, В. Е. Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных экспериментах с крысами. // Космическая биология и авиакосмическая медицина. – 1980. – Т. 14 – N. 3 - С. 79-80.
7. Ковальчук, Л. В., Ганковская, Л. В., Мешкова, Р. Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. Москва, "ГЭОТАР-Медиа" – 2011. – С. 640.
8. Константинова, И. В. Система иммунитета в экстремальных условиях. Космическая иммунология. М. Наука. – 1988. – С. 288.
9. Константинова, И. В., Антропова, Е. Н. Иммунологическая реактивность организма при обитании в герметичных помещениях. // Проблемы космической биологии. – 1980. – Т. 42 – С. 191-213.
10. Крючков, Н. А., Бабахин, А. А., Башкатова, Ю. Н., Козмин, Л. Д., Барсигян, Г. Г., Хаитов, М. Р., Мартынов, А. И. Краткосрочная безадыювантная модель IgE-зависимой бронхиальной астмы у лабораторных мышей с использованием аллергена

- пыльцы тимофеевки. // Российский аллергологический журнал. – 2008. – Т. 4 – С. 37-45.
11. Крючков, Н. А., Бабахин, А. А., Хаитов, М. Р. Моделирование бронхиальной астмы у лабораторных мышей общие принципы и значение. // Физиология и патология иммунной системы. – 2008. – Т. 3 – С. 3-7.
 12. Крючков, Н. А., Башкатова, Ю. Н., Хаитов, М. Р. Биологические модели IgE-зависимой бронхиальной астмы: методологические особенности и перспективы применения. // Вестник российской АМН. – 2010. – Т. 7 – С. 22-28.
 13. Литвин, Л. С. Разработка модели экспериментальной IgE-зависимой бронхиальной астмы для изучения новых подходов к аллерген-специфической иммунотерапии: дис. канд. мед. наук. Г. И. и Ф. России. Москва. – 2007. – С. 138.
 14. Литвин, Л. С., Бабахин, А. А., Хаитов, М. Р. Модели экспериментальной атопической бронхиальной астмы. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2006. – Т. 3 – С. 26-29.
 15. Мешков, Д. О. Влияние факторов космического полета на эффекторные механизмы естественной цитотоксичности. Автореферат диссертации. канд. мед. наук., Москва. – 1990.
 16. Мешков, Д. О. Влияние факторов космического полета на иммунитет. // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2001. – Т. 35 – N. 2 – С. 14-21.
 17. Моруков, Б. В., Рыкова, М. П., Антропова, Е. Н., Берендеева, Т. А., Моруков, И. Б., Пономарев, С. А. Иммунологические аспекты пилотируемого марсианского полета. // Физиология человека. – 2013. – Т. 39 – N. 2 – С. 19-30.
 18. Нефедов, Ю. Г., Залогеев, С. Н. О проблеме обитаемости космических кораблей. // Космическая биология. – 1967. - Т. 1 – С. 30.
 19. Пономарев, С. А., Рыкова, М. П., Антропова, Е. Н., Берендеева, Т. А., Моруков, Б. В. Состояние системы врожденного иммунитета человека в условиях 5-суточной «сухой» иммерсии. // Авиационная и экологическая медицина. – 2011. – Т. 45 – N. 3 – С. 17-23.

20. Рыкова, М. П. Влияние факторов космического полета на функциональную активность лимфоцитов нормальных киллеров. Автореферат диссертации. канд. мед. наук., Москва. – 1984.
21. Рыкова, М. П., Герцик, Ю. Г., Антропова, Е. Н., Буравкова, Л. Б. Уровень сывороточных иммуноглобулинов, аллерген-специфических IgE-антител и интерлейкина-4 у космонавтов до и после кратковременных космических полетов на международной космической станции. // Физиология человека. – 2006. – Т. 32 – N. 4 – С. 97-101.
22. Савина, В. П., Кузнецова, Т. И. Источники загрязнения атмосферы кабин микропримесями и их токсикологическая оценка. // Проблемы космической биологии. – 1980. – Т. 42 – С. 11-43.
23. Сухих, Г. Т., Меерсон, Ф. З. Подавление активности нормальных киллеров при эмоционально-болевым стрессе. // Бюллетень экспер. биол. – 1983. – Т. 11 – С. 84.
24. 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 – С. 328-330.
25. 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 – N. 11 – С. 1643-1657.
26. Afshar, R., Medoff, B. D., Luster, A. D. Allergic asthma: a tale of many T cells. // Clin Exp Allergy. – 2008. - V. 38 – N. 12 - P. 1847-1857.
27. Aki, T., Fujikawa, A., Wada, T., Jyo, T., Shigeta, S., Murooka, Y., Oka, S., Ono, K. Cloning and expression of cDNA coding for a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*: homology with human heat shock cognate proteins in the heat shock protein 70 family. // J Biochem. – 1994. - V. 115 – N. 3 - P. 435-440.
28. Albrecht, D., Guthke, R., Brakhage, A. A., Kniemeyer, O. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. // BMC Genomics. – 2010. - V. 11 - P. 32.

29. Anderson, G. P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. // *Lancet*. – 2008. - V. 372 – N. 9643 - P. 1107-1119.
30. Andersson, A., Rasool, O., Schmidt, M., Kodzius, R., Fluckiger, S., Zargari, A., Cramer, R., Scheynius, A. Cloning, expression and characterization of two new IgE-binding proteins from the yeast *Malassezia sympodialis* with sequence similarities to heat shock proteins and manganese superoxide dismutase. // *Eur J Biochem*. – 2004. - V. 271 – N. 10 - P. 1885-1894.
31. Antonova, O. Y., Yurinskaya, M. M., Evgen'ev, M. B., Suslikov, A. V., Vinokurov, M. G. Exogenous heat shock protein HSP70 protects human blood phagocytes at the action of different chemotypes of lipopolysaccharide. // *Dokl Biol Sci*. – 2012. - V. 447 - P. 392-395.
32. Arispe, N., Doh, M., De Maio, A. Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins Hsc70 and Hsp70. // *Cell Stress Chaperones*. – 2002. - V. 7 – N. 4 - P. 330-338.
33. Asea, A. Heat shock proteins and toll-like receptors. // *Handb Exp Pharmacol*. – 2008. – N. 183 - P. 111-127.
34. Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C., Calderwood, S. K. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. // *Nat Med*. – 2000. - V. 6 – N. 4 - P. 435-442.
35. Assimon, V. A., Gillies, A. T., Rauch, J. N., Gestwicki, J. E. Hsp70 protein complexes as drug targets. // *Curr Pharm Des*. – 2013. - V. 19 – N. 3 - P. 404-417.
36. Atherton, H. C., Jones, G., Danahay, H. IL-13-induced changes in the goblet cell density of human bronchial epithelial cell cultures: MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase regulation. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2003. - V. 285 – N. 3 - P. L730-739.
37. Aviles, H., Belay, T., Fountain, K., Vance, M., Sonnenfeld, G. Increased susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infection under hindlimb-unloading conditions. // *J Appl Physiol*. – 2003. - V. 95 – N. 1 - P. 73-80.

38. Barnes, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. // *Nat Rev Immunol.* – 2008. - V. 8 – N. 3 - P. 183-192.
39. Barrientos, L., Marin-Esteban, V., de Chaisemartin, L., Le-Moal, V. L., Sandre, C., Bianchini, E., Nicolas, V., Pallardy, M., Chollet-Martin, S. An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. // *Front Immunol.* – 2013. - V. 4 - P. 166.
40. Bascove, M., Gueguinou, N., Schaerlinger, B., Gauquelin-Koch, G., Frippiat, J. P. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. // *FASEB J.* – 2011. - V. 25 – N. 9 - P. 2947-2955.
41. Bascove, M., Huin-Schohn, C., Gueguinou, N., Tschirhart, E., Frippiat, J. P. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. // *FASEB J.* – 2009. - V. 23 – N. 5 - P. 1607-1615.
42. Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., Srivastava, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. // *Int Immunol.* – 2000. - V. 12 – N. 11 - P. 1539-1546.
43. Benjamin, I. J., McMillan, D. R. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. // *Circ Res.* – 1998. - V. 83 – N. 2 - P. 117-132.
44. Bentley, J. K., Hershenson, M. B. Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. // *Proc Am Thorac Soc.* – 2008. - V. 5 – N. 1 - P. 89-96.
45. Binia, A., Kabesch, M. Respiratory medicine - genetic base for allergy and asthma. // *Swiss Med Wkly.* – 2012. - V. 142 - P. w13612.
46. Blom, L., Poulsen, L. K. IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. // *J Immunol.* – 2012. - V. 189 – N. 9 - P. 4331-4337.
47. Boonyaratanakornkit, J. B., Cogoli, A., Li, C. F., Schopper, T., Pippia, P., Galleri, G., Meloni, M. A., Hughes-Fulford, M. Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. // *FASEB J.* – 2005. - V. 19 – N. 14 - P. 2020-2022.

48. Borges, T. J., Wieten, L., van Herwijnen, M. J., Broere, F., van der Zee, R., Bonorino, C., van Eden, W. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. // *Front Immunol.* – 2012. - V. 3 - P. 95.
49. Bork, P., Sander, C., Valencia, A. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1992. - V. 89 – N. 16 - P. 7290-7294.
50. Boxio, R., Dournon, C. Frippiat, J. P. Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. // *J Appl Physiol.* – 2005. - V. 98 – N. 3 - P. 905-910.
51. Bradding, P., Walls, A. F., Holgate, S. T. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2006. - V. 117 – N. 6 - P. 1277-1284.
52. Breitenbach, M., Simon-Nobbe, B. The allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*. // *Chem Immunol.* – 2002. - V. 81 - P. 48-72.
53. Brenu, E. W., Staines, D. R., Tajouri, L., Huth, T., Ashton, K. J., Marshall-Gradisnik, S. M. Heat shock proteins and regulatory T cells. // *Autoimmune Dis.* – 2013. - V. 2013 - P. 813256.
54. Brusselle, G. G., Maes, T., Bracke, K. R. Eosinophils in the spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. // *Nat Med.* – 2013. - V. 19 – N. 8 - P. 977-979.
55. Calixto, M. C., Lintomen, L., Schenka, A., Saad, M. J., Zanesco, A., Antunes, E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. // *Br J Pharmacol.* – 2010. - V. 159 – N. 3 - P. 617-625.
56. Cerqueira, G. C., Arnaud, M. B., Inglis, D. O., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Simison, M., Miyasato, S. R., Binkley, J., Orvis, J., Shah, P., Wymore, F., Sherlock, G., Wortman, J. R. The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. // *Nucleic Acids Res.* – 2013. - V. 42 – N. Database issue - P. D705-710.

57. Chapes, S. K., Mastro, A. M., Sonnenfeld, G., Berry, W. D. Antiorthostatic suspension as a model for the effects of spaceflight on the immune system. // *J Leukoc Biol.* – 1993. - V. 54 – N. 3 - P. 227-235.
58. Chen, Y., Yao, Y., Sumi, Y., Li, A., To, U. K., Elkhali, A., Inoue, Y., Woehrle, T., Zhang, Q., Hauser, C., Junger, W. G. Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. // *Sci Signal.* – 2010. - V. 3 – N. 125 - P. ra45.
59. Chuang, J. G., Su, S. N., Chiang, B. L., Lee, H. J., Chow, L. P. Proteome mining for novel IgE-binding proteins from the German cockroach (*Blattella germanica*) and allergen profiling of patients. // *Proteomics.* – 2010. - V. 10 – N. 21 - P. 3854-3867.
60. Conrad, M. L., Yildirim, A. O., Sonar, S. S., Kilic, A., Sudowe, S., Lunow, M., Teich, R., Renz, H., Garn, H. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. // *Clin Exp Allergy.* – 2009. - V. 39 – N. 8 - P. 1246-1254.
61. Cramer, R. Immunoglobulin E-binding autoantigens: biochemical characterization and clinical relevance. // *Clin Exp Allergy.* – 2012. - V. 42 – N. 3 - P. 343-351.
62. Crucian, B., Babiak-Vazquez, A., Johnston, S., Pierson, D. L., Ott, C. M., Sams, C. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. // *Int J Gen Med.* – 2016. - V. 9 - P. 383-391.
63. Crucian, B., Simpson, R. J., Mehta, S., Stowe, R., Chouker, A., Hwang, S. A., Actor, J. K., Salam, A. P., Pierson, D., Sams, C. Terrestrial stress analogs for spaceflight associated immune system dysregulation. // *Brain Behav Immun.* – 2014. - V. 39 - P. 23-32.
64. Crucian, B., Stowe, R., Mehta, S., Uchakin, P., Quiariarte, H., Pierson, D., Sams, C. Immune system dysregulation occurs during short duration spaceflight on board the space shuttle. // *J Clin Immunol.* – 2013. - V. 33 - N. 2 - P. 456-465.
65. Crucian, B. E., Cabbage, M. L., Sams, C. F. Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. // *J Interferon Cytokine Res.* – 2000. - V. 20 – N. 6 - P. 547-556.
66. Crucian, B. E., Stowe, R. P., Pierson, D. L., Sams, C. F. Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. // *Aviat Space Environ Med.* – 2008. - V. 79 – N. 9 - P. 835-843.

67. Custovic, A., Simpson, A. The role of inhalant allergens in allergic airways disease. // *J Investig Allergol Clin Immunol.* – 2012. - V. 22 – N. 6 - P. 393-401.
68. Dapul-Hidalgo, G., Bielory, L. Climate change and allergic diseases. // *Ann Allergy Asthma Immunol.* – 2012. - V. 109 – N. 3 - P. 166-172.
69. De Maio, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. // *Cell Stress Chaperones.* – 2011. - V. 16 – N. 3 - P. 235-249.
70. Deaglio, S., Robson, S. C. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. // *Adv Pharmacol.* – 2011. - V. 61 - P. 301-332.
71. Dhabhar, F. S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. // *Neuroimmunomodulation.* – 2009. - V. 16 – N. 5 - P. 300-317.
72. Durrant, D. M., Metzger, D. W. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. // *Immunol Invest.* – 2010. - V. 39 - N 4-5 - P. 526-549.
73. Dworski, R., Simon, H. U., Hoskins, A., Yousefi, S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2011. - V. 127 – N. 5 - P. 1260-1266.
74. Elias, J. A., Lee, C. G., Zheng, T., Ma, B., Homer, R. J., Zhu, Z. New insights into the pathogenesis of asthma. // *J Clin Invest.* – 2003. - V. 111 – N. 3 - P. 291-297.
75. Felix, K., Wise, K., Manna, S., Yamauchi, K., Wilson, B. L., Thomas, R. L., Kulkarni, A., Pellis, N. R., Ramesh, G. T. Altered cytokine expression in tissues of mice subjected to simulated microgravity. // *Mol Cell Biochem.* – 2004. - V. 266 – N. 1-2 - P. 79-85.
76. Firan, M., Dhillon, S., Estess, P., Siegelman, M. H. Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44. // *Blood.* – 2006. - V. 107 – N. 2 - P. 619-627.
77. Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C., Rossi, A. G. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. // *J Innate Immun.* – 2010. - V. 2 – N. 3 - P. 216-227.

78. Fujibayashi, T., Hashimoto, N., Jijiwa, M., Hasegawa, Y., Kojima, T., Ishiguro, N. Protective effect of geranylgeranylacetone, an inducer of heat shock protein 70, against drug-induced lung injury/fibrosis in an animal model. // *BMC Pulm Med.* – 2009. - V. 9 - P. 45.
79. Gaignier, F., Schenten, V., De Carvalho Bittencourt, M., Gauquelin-Koch, G., Fripiat, J. P., Legrand-Frossi, C. Three weeks of murine hindlimb unloading induces shifts from B to T and from Th to Tc splenic lymphocytes in absence of stress and differentially reduces cell-specific mitogenic responses. // *PLoS One.* – 2014. - V. 9 – N. 3 - P. e92664.
80. Ganter, M. T., Ware, L. B., Howard, M., Roux, J., Gartland, B., Matthay, M. A., Fleshner, M., Pittet, J. F. Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2006. - V. 291 – N. 3 - P. L354-361.
81. Garbuz, D. G., Yushenova, I. A., Zatssepina, O. G., Przhiboro, A. A., Bettencourt, B. R., Evgen'ev, M. B. Organization and evolution of hsp70 clusters strikingly differ in two species of Stratiomyidae (Diptera) inhabiting thermally contrasting environments. // *BMC Evol Biol.* – 2011. - V. 11 - P. 74.
82. Genc, K. O., Gopalakrishnan, R., Kuklis, M. M., Maender, C. C., Rice, A. J., Bowersox, K. D., Cavanagh, P. R. Foot forces during exercise on the International Space Station. // *J Biomech.* – 2010. - V. 43 – N. 15 - P. 3020-3027.
83. GeurtsvanKessel, C. H., Willart, M. A., van Rijt, L. S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B. E., Hoogsteden, H. C., Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F., Lambrecht, B. N. Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. // *J Exp Med.* - 2008 - V. 205 – N. 7 - P. 1621-1634.
84. Gibbs, S., Spiekstra, S., Corsini, E., McLeod, J., Reinders, J. Dendritic cell migration assay: A potential prediction model for identification of contact allergens. // *Toxicol In Vitro.* – 2013. – V.7 N.3 – P.1170-1179.
85. Glaab, T., Taube, C., Braun, A., Mitzner, W. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. // *Respir Res.* – 2007. - V. 8 - P. 63.

86. Glader, P., Moller, S., Lilja, J., Wieslander, E., Lofdahl, C. G., von Wachenfeldt, K. Cigarette smoke extract modulates respiratory defence mechanisms through effects on T-cells and airway epithelial cells. // *Respir Med.* – 2006. - V. 100 – N. 5 - P. 818-827.
87. Globus, R. K., Morey-Holton, E. Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. // *J Appl Physiol.* – 2016. - V. 120 – N. 10 - P. 1196-1206.
88. Gorini, S., Gatta, L., Pontecorvo, L., Vitiello, L., la Sala, A. Regulation of innate immunity by extracellular nucleotides. // *Am J Blood Res.* – 2013. - V. 3 – N.1 - P. 14-28.
89. Gragerov, A. Gottesman, M. E. Different peptide binding specificities of hsp70 family members. // *J Mol Biol.* – 1994. - V. 241 – N. 2 - P. 133-135.
90. Granato, A., Hayashi, E. A., Baptista, B. J. A., Bellio, M., Nobrega, A. Correction: IL-4 Regulates Bim Expression and Promotes B Cell Maturation in Synergy with BAFF Conferring Resistance to Cell Death at Negative Selection Checkpoints. // *J Immunol.* – 2018. - V. 201 – N. 8 - P. 2520.
91. Gruehn, S., Suphioglu, C., O'Hehir, R. E., Volkmann, D. Molecular cloning and characterization of hazel pollen protein (70 kD) as a luminal binding protein (BiP): a novel cross-reactive plant allergen. // *Int Arch Allergy Immunol.* – 2003. - V. 131 – N. 2 - P. 91-100.
92. Gubernatorova, E. O., Gorshkova, E. A., Namakanova, O. A., Zvartsev, R. V., Hidalgo, J., Drutskaya, M. S., Tumanov, A. V., Nedospasov, S. A. Non-redundant Functions of IL-6 Produced by Macrophages and Dendritic Cells in Allergic Airway Inflammation. // *Front Immunol.* – 2018. - V. 9 - P. 2718.
93. Gueguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J. L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C., Fripiat, J. P. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? // *J Leukoc Biol.* – 2009. - V. 86 – N. 5 - P. 1027-1038.
94. Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M. A., Kool, M., Muskens, F., Lambrecht, B. N. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. // *J Exp Med.* – 2010. - V. 207 – N. 10 - P. 2097-2111.

95. Hinchado, M. D., Giraldo, E., Ortega, E. Adrenoreceptors are involved in the stimulation of neutrophils by exercise-induced circulating concentrations of Hsp72: cAMP as a potential "intracellular danger signal". // *J Cell Physiol.* – 2012. - V. 227 - N 2 - P. 604-608.
96. Holmes, A. M., Solari, R., Holgate, S. T. Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. // *Drug Discov Today.* – 2011. - V. 16 – N. 15-16 - P. 659-670.
97. Hoselton, S. A., Samarasinghe, A. E., Seydel, J. M., Schuh, J. M. An inhalation model of airway allergic response to inhalation of environmental *Aspergillus fumigatus* conidia in sensitized BALB/c mice. // *Med Mycol.* – 2010. - V. 48 – N. 8 - P. 1056-1065.
98. Hoymann, H. G. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. // *J Pharmacol Toxicol Methods.* – 2007. - V. 55 – N. 1 - P. 16-26.
99. Huin-Schohn, C., Gueguinou, N., Schenten, V., Bascove, M., Koch, G. G., Baatout, S., Tschirhart, E., Fripiat, J. P. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. // *FASEB J.* – 2013. - V. 27 – N. 1 - P. 333-341.
100. Idzko, M., Dichmann, S., Ferrari, D., Di Virgilio, F., la Sala, A., Girolomoni, G., Panther, E., Norgauer, J. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors. // *Blood.* – 2002. - V. 100 – N. 3 - P. 925-932.
101. Idzko, M., Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Willart, M. A., Muskens, F., Hoogsteden, H. C., Luttmann, W., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Virchow, J. C., Jr., Lambrecht, B. N. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. // *Nat Med.* – 2007. - V. 13 – N. 8 - P. 913-919.
102. Jang, T. Y., Heo, M. J., Jung, A. Y., Kim, Y. H. Prolonged Anti-Orthostatic Hind Limb Unloading and Murine Allergic Asthma. // *Aerospace Medicine and Human Performance.* – 2015. - V. 86 – N. 9 - P. 803-807.
103. Jenei, Z. M., Szeplaki, G., Merkely, B., Karadi, I., Zima, E., Prohaszka, Z. Persistently elevated extracellular HSP70 (HSPA1A) level as an independent prognostic

- marker in post-cardiac-arrest patients. // *Cell Stress Chaperones*. – 2013. - V. 18 – N. 4 - P. 447-454.
104. Johnson, J. D., Fleshner, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. // *J Leukoc Biol*. – 2006. - V. 79 – N. 3 - P. 425-434.
105. Johnson, J. R., Wiley, R. E., Fattouh, R., Swirski, F. K., Gajewska, B. U., Coyle, A. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Ellis, R., Inman, M. D., Jordana, M. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. // *Am J Respir Crit Care Med*. - 2004 - V. 169 – N. 3 - P. 378-385.
106. Joly, A. L., Wettstein, G., Mignot, G., Ghiringhelli, F., Garrido, C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. // *J Innate Immun*. – 2010. - V. 2 – N. 3 - P. 238-247.
107. Kampinga, H. H., Craig, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2010. - V. 11 – N. 8 - P. 579-592.
108. Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., Cheetham, M. E., Chen, B., Hightower, L. E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. // *Cell Stress Chaperones*. – 2009. - V. 14 – N. 1 - P. 105-111.
109. Karol, M. H. Animal models of occupational asthma. // *Eur Respir J*. – 1994. - V. 7 – N. 3 - P. 555-568.
110. Kimzey, S. L., Johnson, P. C., Ritzman, S. E., Mengel, C. E. Hematology and immunology studies: the second manned Skylab mission. // *Aviat Space Environ Med*. – 1976. - V. 47 – N. 4 - P. 383-390.
111. Kips, J. C., Anderson, G. P., Fredberg, J. J., Herz, U., Inman, M. D., Jordana, M., Kemeny, D. M., Lotvall, J., Pauwels, R. A., Plopper, C. G., Schmidt, D., Sterk, P. J., Van Oosterhout, A. J., Vargaftig, B. B., Chung, K. F. Murine models of asthma. // *Eur Respir J*. – 2003. - V. 22 – N. 2 - P. 374-382.
112. Kityk, R., Kopp, J., Sinning, I., Mayer, M. P. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. // *Mol Cell*. – 2012. - V. 48 – N. 6 - P. 863-874.

113. Kobayashi, Y. Neutrophil biology: an update. // *EXCLI J.* – 2015. - V. 14 - P. 220-227.
114. Kohler, A., De Filippo, K., Hasenberg, M., van den Brandt, C., Nye, E., Hosking, M. P., Lane, T. E., Mann, L., Ransohoff, R. M., Hauser, A. E., Winter, O., Schraven, B., Geiger, H., Hogg, N., Gunzer, M. G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. // *Blood.* – 2011. - V. 117 – N. 16 - P. 4349-4357.
115. Konga, D. B., Kim, Y., Hong, S. C., Roh, Y. M., Lee, C. M., Kim, K. Y., Lee, S. M. Oxidative stress and antioxidant defenses in asthmatic murine model exposed to printer emissions and environmental tobacco smoke. // *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* – 2009. - V. 28 – N. 4 - P. 325-340.
116. Konstantinova, I. V. Immune resistance of man in space flight. // *Acta Astronautica.* – 1991. - V. 23 - P. 123-127.
117. Konstantinova, I. V., Fuchs, B. B. The immune system in space and other extreme conditions. // *Harwood Acad. Publ.* – 1991. - P. 112-144.
118. Konstantinova, I. V., Rykova, M. P., Lesnyak, A. T., Antropova, E. A. Immune changes during long-duration mission. // *Journal of Leukocyte Biology.* – 1993. - V. 54 – N. 3 - P. 189-201.
119. Kumar, R. K., Foster, P. S. Are mouse models of asthma appropriate for investigating the pathogenesis of airway hyper-responsiveness? // *Front Physiol.* – 2012. - V. 3 - P. 312.
120. Kusmartsev, S. A., Li, Y., Chen, S. H. Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. // *J Immunol.* – 2000. - V. 165 – N. 2 - P. 779-785.
121. Lambrecht, B. N. Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. // *Allergy.* – 2005. - V. 60 – N. 3 - P. 271-282.
122. Lambrecht, B. N., Hammad, H. The immunology of asthma. // *Nat Immunol.* – 2015. - V. 16 – N. 1 - P. 45-56.
123. Leach, C. S., Rambaut, P. C., Johnson, P. C. Adrenocortical responses of the Apollo 17 crew members. // *Aerosp Med.* – 1974. - V. 45 – N. 5 - P. 529-534.

124. Lemanske, R. F., Jr., Busse, W. W. Asthma. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2003. - V. 111 – N. 2 Suppl. - P. 502-519.
125. Lescale, C., Schenten, V., Djeghloul, D., Bennabi, M., Gaignier, F., Vandamme, K., Strazielle, C., Kuzniak, I., Petite, H., Dosquet, C., Frippiat, J. P., Goodhardt, M. Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. // *FASEB J.* – 2015. - V. 29 – N. 2 - P. 455-463.
126. Li, M., Holmes, V., Zhou, Y., Ni, H., Sanzari, J. K., Kennedy, A. R., Weissman, D. Hindlimb suspension and SPE-like radiation impairs clearance of bacterial infections. // *PLoS One.* – 2014. - V. 9 – N. 1 - P. e85665.
127. Liu, D. J., Hammer, D., Komlos, D., Chen, K. Y., Firestein, B. L., Liu, A. Y. SIRT1 knockdown promotes neural differentiation and attenuates the heat shock response. // *J Cell Physiol.* – 2014. - V. 229 – N. 9 - P. 1224-1235.
128. Liu, J., Harberts, E., Tammaro, A., Girardi, N., Filler, R. B., Fischelevich, R., Temann, A., Licon-Limon, P., Girardi, M., Flavell, R. A., Gaspari, A. A. IL-9 regulates allergen-specific Th1 responses in allergic contact dermatitis. // *J Invest Dermatol.* – 2014. - V. 134 – N. 7 - P. 1903-1911.
129. Liu, K., Victora, G. D., Schwickert, T. A., Guermontprez, P., Meredith, M. M., Yao, K., Chu, F. F., Randolph, G. J., Rudensky, A. Y., Nussenzweig, M. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. // *Science.* – 2009. - V. 324 – N. 5925 - P. 392-397.
130. Lloyd, C. M., Saglani, S. T cells in asthma: influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2013. - V. 131 – N. 5 - P. 1267-1274; quiz 1275.
131. Lommatzsch, M., Julius, P., Kuepper, M., Garn, H., Bratke, K., Irmscher, S., Luttmann, W., Renz, H., Braun, A., Virchow, J. C. The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2006. - V. 118 – N. 1 - P. 91-97.
132. Lu, T., Kobayashi, S. D., Quinn, M. T., Deleo, F. R. A NET Outcome. // *Front Immunol.* – 2015. - V. 3 - P. 365.

133. Luger, E. O., Fokuhl, V., Wegmann, M., Abram, M., Tillack, K., Achatz, G., Manz, R. A., Worm, M., Radbruch, A., Renz, H. Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2009. - V. 124 – N. 4 - P. 819-826.
134. Mader, T. H., Gibson, C. R., Pass, A. F., Kramer, L. A., Lee, A. G., Fogarty, J., Tarver, W. J., Dervay, J. P., Hamilton, D. R., Sargsyan, A., Phillips, J. L., Tran, D., Lipsky, W., Choi, J., Stern, C., Kuyumjian, R., Polk, J. D. Optic disc edema, globe flattening, choroidal folds, and hyperopic shifts observed in astronauts after long-duration space flight. // *Ophthalmology.* – 2011. - V. 118 – N. 10 - P. 2058-2069.
135. Mambula, S. S., Stevenson, M. A., Ogawa, K., Calderwood, S. K. Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader. // *Methods.* – 2007. - V. 43 – N. 3 - P. 168-175.
136. Mantel, P. Y., Kuipers, H., Boyman, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Lambrecht, B. N., Hendriks, R. W., Cramer, R., Akdis, C. A., Blaser, K., Schmidt-Weber, C. B. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. // *PLoS Biol.* – 2007. - V. 5 – N. 12 - P. e329.
137. Mao, X. W., Pecaut, M. J., Stodieck, L. S., Ferguson, V. L., Bateman, T. A., Bouxsein, M., Jones, T. A., Moldovan, M., Cunningham, C. E., Chieu, J., Gridley, D. S. Spaceflight environment induces mitochondrial oxidative damage in ocular tissue. // *Radiat Res.* – 2013. - V. 180 – N. 4 - P. 340-350.
138. Mayer, M. P., Bukau, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. // *Cell Mol Life Sci.* – 2005. - V. 62 – N. 6 - P. 670-684.
139. Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., Gonzalez-Garcia, I., Brieva, J. A. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. // *Blood.* – 2002. - V. 99 – N. 6 - P. 2154-2161.
140. Mehta, S. K., Crucian, B. E., Stowe, R. P., Simpson, R. J., Ott, C. M., Sams, C. F., Pierson, D. L. Reactivation of latent viruses is associated with increased plasma cytokines in astronauts. // *Cytokine.* – 2013. - V. 61 – N. 1 - P. 205-209.

141. Mel'nikov, E. E., Rotanova, T. V. [Molecular chaperones]. // *Bioorg Khim.* – 2010. - V. 36 – N. 1 - P. 5-14.
142. Menoret, A. Purification of recombinant and endogenous HSP70s. // *Methods.* – 2004. - V. 32 – N. 1 - P. 7-12.
143. Mermel, L. A. Infection prevention and control during prolonged human space travel. // *Clin Infect Dis.* – 2013. - V. 56 – N. 1 - P. 123-130.
144. Miller, E. S., Sonnenfeld, G. Influence of suspension on the expression of protective immunological memory to murine *Listeria monocytogenes* infection. // *J Leukoc Biol.* – 1993. - V. 54 – N. 6 - P. 578-583.
145. Miller, E. S., Sonnenfeld, G. Influence of antiorthostatic suspension on resistance to murine *Listeria monocytogenes* infection. // *J Leukoc Biol.* – 1994. - V. 55 – N. 3 - P. 371-378.
146. Mjosberg, J., Spits, H. Type 2 innate lymphoid cells-new members of the "type 2 franchise" that mediate allergic airway inflammation. // *Eur J Immunol.* – 2012. - V. 42 – N. 5 - P. 1093-1096.
147. Mohr, E., Serre, K., Manz, R. A., Cunningham, A. F., Khan, M., Hardie, D. L., Bird, R., MacLennan, I. C. Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. // *J Immunol.* – 2009. - V. 182 – N. 4 - P. 2113-2123.
148. Momken, I., Stevens, L., Bergouignan, A., Desplanches, D., Rudwill, F., Chery, I., Zahariev, A., Zahn, S., Stein, T. P., Sebedio, J. L., Pujos-Guillot, E., Falempin, M., Simon, C., Coxam, V., Andrianjafiniony, T., Gauquelin-Koch, G., Picquet, F., Blanc, S. Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. // *FASEB J.* – 2011. - V. 25 – N. 10 - P. 3646-3660.
149. Morey-Holton, E., Globus, R. K., Kaplansky, A., Durnova, G. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. // *Adv Space Biol Med.* – 2005. - V. 10 - P. 7-40.
150. Morey-Holton, E. R., Globus, R. K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. // *J Appl Physiol.* – 2002. - V. 92 – N. 4 - P. 1367-1377.

151. Morgan, D. J., Casulli, J., Chew, C., Connolly, E., Lui, S., Brand, O. J., Rahman, R., Jagger, C., Hussell, T. Innate Immune Cell Suppression and the Link With Secondary Lung Bacterial Pneumonia. // *Front Immunol.* – 2018. - V. 9 - P. 2943.
152. Mortaz, E., Engels, F., Nijkamp, F. P., Redegeld, F. A. New insights on the possible role of mast cells in aspirin-induced asthma. // *Curr Mol Pharmacol.* – 2009. - V. 2 – N. 2 - P. 182-189.
153. Morukov, B., Rykova, M., Antropova, E., Berendeeva, T., Ponomaryov, S., Larina, I. T-cell immunity and cytokine production in cosmonauts after long-duration space flights. // *Acta Astronautica.* – 2011. - V. 68 - P. 739-746.
154. Mosca, T., Menezes, M. C., Silva, A. V., Stirbulov, R., Forte, W. C. Chemotactic and Phagocytic Activity of Blood Neutrophils in Allergic Asthma. // *Immunol Invest.* – 2015. - V. 44 – N. 5 - P. 509-520.
155. Motta, A., Schmitz, C., Rodrigues, L., Ribeiro, F., Teixeira, C., Detanico, T., Bonan, C., Zwickey, H., Bonorino, C. Mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. // *Immunology.* – 2007. - V. 121 – N. 4 - P. 462-472.
156. Muller, T., Grimm, M., de Vieira, R. P., Cicko, S., Durk, T., Sorichter, S., Zissel, G., Idzko, M. Local administration of uridine suppresses the cardinal features of asthmatic airway inflammation. // *Clin Exp Allergy.* – 2010. - V. 40 – N. 10 - P. 1552-1560.
157. Multhoff, G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. // *Methods.* – 2007. - V. 43 – N. 3 - P. 229-237.
158. Nakagome, K., Matsushita, S., Nagata, M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. // *Int Arch Allergy Immunol.* – 2012. - V. 158 Suppl. 1 - P. 96-102.
159. Nash, P. V., Konstantinova, I. V., Fuchs, B. B., Rakhmievich, A. L., Lesnyak, A. T., Mastro, A. M. Effect of spaceflight on lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. // *J Appl Physiol.* – 1992. - V. 73 – N. 2 Suppl - P. 186S-190S.
160. Nassenstein, C., Schulte-Herbruggen, O., Renz, H., Braun, A. Nerve growth factor: the central hub in the development of allergic asthma? // *Eur J Pharmacol.* – 2006. - V. 533 – N. 1-3 - P. 195-206.

161. Nials, A. T., Uddin, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. // *Dis Model Mech.* – 2008. - V. 1 – N. 4-5 - P. 213-220.
162. Njemini, R., Lambert, M., Demanet, C., Mets, T. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. // *Scand J Immunol.* – 2003. - V. 58 – N. 6 - P. 664-669.
163. Novoselova, E. G., Lunin, S. M., Khrenov, M. O., Parfenyuk, S. B., Novoselova, T. V., Shenkman, B. S., Fesenko, E. E. Changes in immune cell signalling, apoptosis and stress response functions in mice returned from the BION-M1 mission in space. // *Immunobiology.* – 2015. - V. 220 – N. 4 - P. 500-509.
164. O'Donnell, P. M., Orshal, J. M., Sen, D., Sonnenfeld, G., Aviles, H. O. Effects of exposure of mice to hindlimb unloading on leukocyte subsets and sympathetic nervous system activity. // *Stress.* – 2009. - V. 12 – N. 1 - P. 82-88.
165. Ogawa, K., Seta, R., Shimizu, T., Shinkai, S., Calderwood, S. K., Nakazato, K., Takahashi, K. Plasma adenosine triphosphate and heat shock protein 72 concentrations after aerobic and eccentric exercise. // *Exerc Immunol Rev.* – 2011. - V. 17 - P. 136-149.
166. Ozier, A., Allard, B., Bara, I., Girodet, P. O., Trian, T., Marthan, R., Berger, P. The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathophysiology. // *J Allergy (Cairo).* – 2011. - V. 2011 - P. 742710.
167. Palleros, D. R., Welch, W. J., Fink, A. L. Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1991. - V. 88 – N. 13 - P. 5719-5723.
168. Paul, W. E., Zhu, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? // *Nat Rev Immunol.* – 2010. - V. 10 – N. 4 - P. 225-235.
169. Pecaut, M. J., Simske, S. J., Fleshner, M. Spaceflight induces changes in splenocyte subpopulations: effectiveness of ground-based models. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2000. - V. 279 – N. 6 - P. R2072-2078.
170. Pirkkala, L., Nykanen, P., Sistonen, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. // *FASEB J.* – 2001. - V. 15 – N. 7 - P. 1118-1131.

171. Pittet, J. F., Lee, H., Morabito, D., Howard, M. B., Welch, W. J., Mackersie, R. C. Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival. // *J Trauma.* – 2002. - V. 52 – N. 4 - P. 611-617.
172. Pockley, A. G., De Faire, U., Kiessling, R., Lemne, C., Thulin, T., Frostegard, J. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. // *J Hypertens.* – 2002. - V. 20 – N. 9 - P. 1815-1820.
173. Pockley, A. G., Fairburn, B., Mirza, S., Slack, L. K., Hopkinson, K., Muthana, M. A non-receptor-mediated mechanism for internalization of molecular chaperones. // *Methods.* – 2007. - V. 43 – N. 3 - P. 238-244.
174. Pockley, A. G., Shepherd, J., Corton, J. M. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. // *Immunol Invest.* – 1998. - V. 27 – N. 6 - P. 367-377.
175. Post, S., Nawijn, M. C., Hackett, T. L., Baranowska, M., Gras, R., van Oosterhout, A. J., Heijink, I. H. The composition of house dust mite is critical for mucosal barrier dysfunction and allergic sensitisation. // *Thorax.* – 2012. - V. 67 – N. 6 - P. 488-495.
176. Prado, N., Marazuela, E. G., Segura, E., Fernandez-Garcia, H., Villalba, M., They, C., Rodriguez, R., Batanero, E. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. // *J Immunol.* – 2008. - V. 181 – N. 2 - P. 1519-1525.
177. Quintana, F. J., Cohen, I. R. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. // *J Immunol.* – 2005. - V. 175 – N. 5 - P. 2777-2782.
178. Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., Breiteneder, H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2008. - V. 121 – N. 4 - P. 847-852.
179. Rampelt, H., Mayer, M. P., Bukau, B. Nucleotide exchange factors for Hsp70 chaperones. // *Methods Mol Biol.* – 2011. - V. 787 - P. 83-91.
180. Regal, J. F. Immunologic effector mechanisms in animal models of occupational asthma. // *J Immunotoxicol.* – 2004. - V. 1 – N. 1 - P. 25-37.
181. Renz, H. Asthma protection with bacteria - science or fiction? // *Thorax.* – 2011. - V. 66 – N. 9 - P. 744-745.

182. Reuter, S., Stassen, M., Taube, C. Mast cells in allergic asthma and beyond. // *Yonsei Med J.* – 2010. - V. 51 – N. 6 - P. 797-807.
183. Rivera, C. A., Tchamtchi, M. H., Mendoza, L., Smith, C. W. Endotoxemia and hepatic injury in a rodent model of hindlimb unloading. // *J Appl Physiol.* – 2003. - V. 95 – N. 4 - P. 1656-1663.
184. Robinson, M. J., Prout, M., Mearns, H., Kyle, R., Camberis, M., Forbes-Blom, E. E., Paul, W. E., Allen, C. D., Le Gros, G. IL-4 Haploinsufficiency Specifically Impairs IgE Responses against Allergens in Mice. // *J Immunol.* – 2017. - V. 198 – N. 5 - P. 1815-1822.
185. Rohrer, K. M., Haug, M., Schworer, D., Kalbacher, H., Holzer, U. Mutations in the substrate binding site of human heat-shock protein 70 indicate specific interaction with HLA-DR outside the peptide binding groove. // *Immunology.* – 2014. - V. 142 – N. 2 - P. 237-247.
186. Ruiz-Lafuente, N., Muro, M., Minguela, A., Parrado, A. The transcriptional response of mouse spleen B cells to IL-4: Comparison to the response of human peripheral blood B cells. // *Biochem Biophys Rep.* – 2018. - V. 16 - P. 56-61.
187. Sajjan, U., Wang, Q., Zhao, Y., Gruenert, D. C., Hershenson, M. B. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2008. - V. 178 – N. 12 - P. 1271-1281.
188. Sakai, K., Yokoyama, A., Kohno, N., Hamada, H., Hiwada, K. Prolonged antigen exposure ameliorates airway inflammation but not remodeling in a mouse model of bronchial asthma. // *Int Arch Allergy Immunol.* – 2001. - V. 126 – N.2 - P. 126-134.
189. Sakai, K., Yokoyama, A., Kohno, N., Hiwada, K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. // *Clin Exp Immunol.* – 1999. - V. 118 – N. 1 - P. 9-15.
190. Samarasinghe, A. E., Hoselton, S. A., Schuh, J. M. A comparison between intratracheal and inhalation delivery of *Aspergillus fumigatus* conidia in the development of fungal allergic asthma in C57BL/6 mice. // *Fungal Biol.* – 2011. - V. 115 – N. 1 - P. 21-29.

191. Schlecht, R., Erbse, A. H., Bukau, B., Mayer, M. P. Mechanics of Hsp70 chaperones enables differential interaction with client proteins. // *Nat Struct Mol Biol.* – 2011. - V. 18 – N. 3 - P. 345-351.
192. Schleimer, R. P., Kato, A., Kern, R., Kuperman, D., Avila, P. C. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2007. - V. 120 – N. 6 - P. 1279-1284.
193. Schmitt, D. A., Abbal, M., Rykova, M., Meshkov, D. O. Immune responses in extreme environments. // *J Gravit Physiol.* – 1998. - V. 5 – N. 1 - P. 9-11.
194. Schwarzenberg, M., Pippia, P., Meloni, M. A., Cossu, G., Cogoli-Greuter, M., Cogoli, A. Signal transduction in T lymphocytes--a comparison of the data from space, the free fall machine and the random positioning machine. // *Adv Space Res,* – 1999, - V. 24 – N, 6 - P. 793-800.
195. Shen, H. D., Au, L. C., Lin, W. L., Liaw, S. F., Tsai, J. J., Han, S. H. Molecular cloning and expression of a *Penicillium citrinum* allergen with sequence homology and antigenic crossreactivity to a hsp 70 human heat shock protein. // *Clin Exp Allergy.* – 1997. - V. 27 – N. 6 - P. 682-690.
196. Shevach, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. // *Nat Rev Immunol.* – 2002. - V. 2 – N. 6 - P. 389-400.
197. Shin, Y. S., Takeda, K., Gelfand, E. W. Understanding asthma using animal models. // *Allergy Asthma Immunol Res.* – 2009. - V. 1 – N. 1 - P. 10-18.
198. Singh, B., Sharma, G. L., Oellerich, M., Kumar, R., Singh, S., Bhadoria, D. P., Katyal, A., Reichard, U., Asif, A. R. Novel cytosolic allergens of *Aspergillus fumigatus* identified from germinating conidia. // *J Proteome Res.* – 2011. - V. 9 – N. 11 - P. 5530-5541.
199. Spielmann, G., Agha, N. H., Kunz, H. E., Simpson, R. J., Crucian, B. E., Mehta, S. K., Laughlin, M., Campbell, J. B-cell homeostasis is maintained during long duration spaceflight. // *J Appl Physiol.* – 2019. – V.126 – N.2 – P. 469-476.
200. Srivastava, P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. // *Annu Rev Immunol.* – 2002. - V. 20 - P. 395-425.

201. Stavnezer, J. Immunoglobulin class switching. // *Curr Opin Immunol.* – 1996. - V. 8 – N. 2 - P. 199-205.
202. Stocki, P., Dickinson, A. M. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. // *Autoimmune Dis.* – 2012. - V. 2012 - P. 617213.
203. Stocki, P., Morris, N. J., Preisinger, C., Wang, X. N., Kolch, W., Multhoff, G., Dickinson, A. M. Identification of potential HLA class I and class II epitope precursors associated with heat shock protein 70 (HSPA). // *Cell Stress Chaperones.* – 2010. - V. 15 – N. 5 - P. 729-741.
204. Stumbles, P. A., Strickland, D. H., Wikstrom, M. E., Thomas, J. A., von Garnier, C., Holt, P. G. Identification and isolation of rodent respiratory tract dendritic cells. // *Methods Mol Biol.* – 2009. - V. 595 - P. 249-263.
205. Sugamata, R., Donko, A., Murakami, Y., Boudreau, H. E., Qi, C. F., Kwon, J., Leto, T. L. Duox1 Regulates Primary B Cell Function under the Influence of IL-4 through BCR-Mediated Generation of Hydrogen Peroxide. // *J Immunol.* – 2019. - V. 202 – N. 2 - P. 428-440.
206. Swindle, E. J., Collins, J. E., Davies, D. E. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2009. - V. 124 – N. 1 - P. 23-34.
207. Tanaka, K., Tanaka, Y., Namba, T., Azuma, A., Mizushima, T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. // *Biochem Pharmacol.* – 2010. - V. 80 – N. 6 - P. 920-931.
208. Tangye, S. G., Ma, C. S., Brink, R., Deenick, E. K. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. // *Nat Rev Immunol.* – 2013. - V. 13 – N. 6 - P. 412-426.
209. Taylor, G. R., Janney, R. P. In vivo testing confirms a blunting of the human cell-mediated immune mechanism during space flight. // *J Leukoc Biol.* – 1992. - V. 51 – N. 2 - P. 129-132.
210. Taylor, G. R., Neale, L. S., Dardano, J. R. Immunological analyses of U.S. Space Shuttle crewmembers. // *Aviat Space Environ Med.* – 1986. - V. 57 – N. 3 - P. 213-217.

211. Temple, M. D., Kosik, K. S., Steward, O. Spatial learning and memory is preserved in rats after early development in a microgravity environment. // *Neurobiol Learn Mem.* – 2002. - V. 78 – N. 2 - P. 199-216.
212. Terlecky, S. R., Chiang, H. L., Olson, T. S., Dice, J. F. Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein. // *J Biol Chem.* – 1992. - V. 267 – N. 13 - P. 9202-9209.
213. Thiesse, J., Namati, E., Sieren, J. C., Smith, A. R., Reinhardt, J. M., Hoffman, E. A., McLennan, G. Lung structure phenotype variation in inbred mouse strains revealed through in vivo micro-CT imaging. // *J Appl Physiol.* – 2010. - V. 109 – N. 6 - P. 1960-1968.
214. Turner, H., Kinet, J. P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. // *Nature.* – 1999. - V. 402 – N. 6760 Suppl. - P. B24-30.
215. Udono, H., Srivastava, P. K. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. // *J Exp Med.* – 1993. - V. 178 – N. 4 - P. 1391-1396.
216. van Ree, R., Hummelshoj, L., Plantinga, M., Poulsen, L. K., Swindle, E. Allergic sensitization: host-immune factors. // *Clin Transl Allergy.* – 2014. - V. 4 – N. 1 - P. 12.
217. van Rijt, L. S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H. C., Lambrecht, B. N. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. // *J Exp Med.* – 2005. - V. 201 – N. 6 - P. 981-991.
218. Veres, T. Z., Rochlitzer, S., Shevchenko, M., Fuchs, B., Prenzler, F., Nassenstein, C., Fischer, A., Welker, L., Holz, O., Muller, M., Krug, N., Braun, A. Spatial interactions between dendritic cells and sensory nerves in allergic airway inflammation. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2007. - V. 37 – N. 5 - P. 553-561.
219. Veres, T. Z., Shevchenko, M., Krasteva, G., Spies, E., Prenzler, F., Rochlitzer, S., Tschernig, T., Krug, N., Kummer, W., Braun, A. Dendritic cell-nerve clusters are sites of T cell proliferation in allergic airway inflammation. // *Am J Pathol.* – 2009. - V. 174 – N. 3 - P. 808-817.

220. Veres, T. Z., Voedisch, S., Spies, E., Valtonen, J., Prenzler, F., Braun, A. Aeroallergen challenge promotes dendritic cell proliferation in the airways. // *J Immunol* – 2013. - V. 190 – N. 3 - P. 897-903.
221. Vitiello, L., Gorini, S., Rosano, G., la Sala, A. Immunoregulation through extracellular nucleotides. // *Blood*. – 2012. - V. 120 – N. 3 - P. 511-518.
222. Vogel, M., Bukau, B., Mayer, M. P. Allosteric regulation of Hsp70 chaperones by a proline switch. // *Mol Cell*. – 2006. - V. 21 – N. 3 - P. 359-367.
223. von Garnier, C., Wikstrom, M. E., Zosky, G., Turner, D. J., Sly, P. D., Smith, M., Thomas, J. A., Judd, S. R., Strickland, D. H., Holt, P. G., Stumbles, P. A. Allergic airways disease develops after an increase in allergen capture and processing in the airway mucosa. // *J Immunol*. – 2007. - V. 179 – N. 9 - P. 5748-5759.
224. Walker, J. A., Barlow, J. L. and McKenzie, A. N. Innate lymphoid cells--how did we miss them? // *Nat Rev Immunol*. – 2013. - V. 13 – N. 2 - P. 75-87.
225. Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Tovey, E. R., Gruenert, D. C., Thompson, P. J., Stewart, G. A., Taylor, G. W., Garrod, D. R., Cannell, M. B., Robinson, C. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. // *J Clin Invest*. – 1999. - V. 104 – N. 1 - P. 123-133.
226. Wang, C. and Lee, M. R. High-level expression of soluble rat hsc70 in *Escherichia coli*: purification and characterization of the cloned enzyme. // *Biochem J*. – 1993. - V. 294 (Pt 1) - P. 69-77.
227. Wei, J., Hendershot, L. M. Characterization of the nucleotide binding properties and ATPase activity of recombinant hamster BiP purified from bacteria. // *J Biol Chem*. – 1995. - V. 270 – N. 44 - P. 26670-26676.
228. Wei, L. X., Zhou, J. N., Roberts, A. I., Shi, Y. F. Lymphocyte reduction induced by hindlimb unloading: distinct mechanisms in the spleen and thymus. // *Cell Res*. – 2003. - V. 13 – N. 6 - P. 465-471.
229. Weichselbaum, M., Sparrow, M. P., Hamilton, E. J., Thompson, P. J. Knight, D. A. A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium. // *Respir Res*. – 2005. - V. 6 - P. 115.

230. Welch, W. J., Feramisco, J. R. Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. // *Mol Cell Biol.* – 1985. - V. 5 – N. 6 - P. 1229-1237.
231. Wenzel, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. // *Nat Med.* – 2012. - V. 18 – N. 5 - P. 716-725.
232. Wheeler, D. S., Chase, M. A., Senft, A. P., Poynter, S. E., Wong, H. R., Page, K. Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. // *Respir Res.* – 2009. - V. 10 - P. 31.
233. Wieten, L., van der Zee, R., Spiering, R., Wagenaar-Hilbers, J., van Kooten, P., Broere, F., van Eden, W. A novel heat-shock protein coinducer boosts stress protein Hsp70 to activate T cell regulation of inflammation in autoimmune arthritis. // *Arthritis Rheum.* – 2010. - V. 62 – N. 4 - P. 1026-1035.
234. Willart, M. A., Lambrecht, B. N. The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma. // *Clin Exp Allergy.* – 2009. - V. 39 – N. 1 - P. 12-19.
235. Woodruff, P. G., Modrek, B., Choy, D. F., Jia, G., Abbas, A. R., Ellwanger, A., Koth, L. L., Arron, J. R., Fahy, J. V. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2009. - V. 180 – N. 5 - P. 388-395.
236. Yang, I. V., Schwartz, D. A. Epigenetic mechanisms and the development of asthma. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2012. - V. 130 – N. 6 - P. 1243-1255.
237. Yang, M., Wu, T., Cheng, L., Wang, F., Wei, Q., Tanguay, R. M. Plasma antibodies against heat shock protein 70 correlate with the incidence and severity of asthma in a Chinese population. // *Respir Res.* – 2005. - V. 6 - P. 18.
238. Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. - V. 1783 – N. 5 - P. 673-694.
239. Yi, B., Rykova, M., Jager, G., Feuerecker, M., Horl, M., Matzel, S., Ponomarev, S., Vassilieva, G., Nichiporuk, I., Chouker, A. Influences of large sets of environmental exposures on immune responses in healthy adult men. // *Sci Rep.* – 2015. - V. 5 - P. 13367.

240. Young, J. C. Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. // *Biochem Cell Biol.* – 2010. - V. 88 – N. 2 - P. 291-300.
241. Yu, S., Kim, H. Y., Chang, Y. J., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T. Innate lymphoid cells and asthma. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2014. - V. 133 – N. 4 - P. 943-950.
242. Zeng, Y., Cao, R., Zhang, T., Li, S., Zhong, W. Design and synthesis of piperidine derivatives as novel human heat shock protein 70 inhibitors for the treatment of drug-resistant tumors. // *Eur J Med Chem.* – 2015. - V. 97 - P. 19-31.
243. Zhang, L., Muradia, G., De Vouge, M. W., Rode, H., Vijay, H. M. An allergenic polypeptide representing a variable region of hsp 70 cloned from a cDNA library of *Cladosporium herbarum*. // *Clin Exp Allergy.* – 1996. - V. 26 – N. 1 - P. 88-95.
244. Zhou, Y., Ni, H., Li, M., Sanzari, J. K., Diffenderfer, E. S., Lin, L., Kennedy, A. R., Weissman, D. Effect of solar particle event radiation and hindlimb suspension on gastrointestinal tract bacterial translocation and immune activation. // *PLoS One* – 2012. - V. 7 – N. 9 - P. e44329.
245. Zimmermann, H., Zebisch, M., Strater, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. // *Purinergic Signal.* – 2012. - V. 8 – N.3 - P. 437-502.
246. Zosky, G. R., Sly, P. D. Animal models of asthma. // *Clin Exp Allergy* – 2007. - V. 37 – N. 7 - P. 973-988.
247. Zwart, S. R., Gregory, J. F., Zeisel, S. H., Gibson, C. R., Mader, T. H., Kinchen, J. M., Ueland, P. M., Ploutz-Snyder, R., Heer, M. A., Smith, S. M. Genotype, B-vitamin status, and androgens affect spaceflight-induced ophthalmic changes. // *FASEB Journal* – 2016. – V. 30 – N. 1 – P.141-148.