

Н. К. Ахматова, М. В. Киселевский

# **Врожденный иммунитет** **противоопухолевый и** **противоинфекционный**

практическая медицина

Москва • 2008

УДК 612.017.11:616-006:616.9  
ББК 52.54  
А95

**Рецензент** — Надежда Борисовна Егорова, д-р мед. наук,  
профессор, заслуженный деятель науки РФ

**Ахматова Н. К., Киселевский М. В.**

А95 Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противоиnфекци-  
онный. — М.: Практическая медицина, 2008. — 256 с.:ил.

ISBN 978-5-98811-111-5

В книге обобщены современные данные литературы, а также результаты соб-  
ственных исследований авторов по проблеме врожденного иммунитета. В послед-  
ние годы произошел пересмотр представлений о значимости и функциональной  
активности системы врожденного иммунитета. Установлена ее важнейшая роль в  
представлении антигенов Т-лимфоцитам и инструктивная функция в определении  
направления их дифференцировки по Th-1 или Th-2 пути. Выявлены молекуляр-  
ные и клеточные механизмы реализации этих функций. На основе этих данных, а  
также используя появившиеся в иммунологии методы определения этих функций,  
авторы провели комплексное исследование по раскрытию механизмов действия  
иммуномодуляторов микробного происхождения на систему врожденного иммуни-  
тета путем установления степени активации основных эффекторов этой системы  
на клеточном (ДК, НК) и молекулярном (цитокины, костимулирующие, адгезивные  
молекулы, МНС и др.) уровнях.

Полученные данные характеризуют механизм действия трех исследованных  
иммуномодуляторов на эффекторные функции врожденного иммунитета, что по-  
зволяет определить стратегию их наиболее рационального использования при раз-  
личной иммунопатологии.

Для врачей-иммунологов, аллергологов, педиатров, научных работников, пре-  
подавателей и студентов медицинских вузов, биологических факультетов универ-  
ситетов.

*Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память  
компьютера или воспроизведена любым способом без предварительного письменного  
разрешения авторов.*

ISBN 978-5-98811-111-5

© Ахматова Н. К., Киселевский М. В.

© «практическая медицина», 2008

Авторы выражают глубокую благодарность всем своим коллегам, принимавшим участие в проведении исследований и соавторам статей, материалы которых использованы при публикации книги. Особую признательность авторы выражают своим учителям, наставникам и друзьям, поддержавшим нас и вдохновившим на исследование механизмов врожденного иммунитета:

академику РАМН, доктору медицинских наук, профессору **Борису Федоровичу Семенову**;

заслуженному деятелю науки РФ, доктору медицинских наук, профессору **Надежде Борисовне Егоровой**;

доктору медицинских наук, заведующей лабораторией терапевтических вакцин НИИВС им. И. И. Мечникова **Екатерине Алексеевне Курбатовой**;

доктору медицинских наук, доценту кафедры гистологии ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия» МЗ РФ **Ольге Витальевне Лебединской**;

доктору медицинских наук, ведущему научному сотруднику лаборатории клеточного иммунитета НИИ ЭДИТО РОНЦ им. Н. Н. Блохина **Федору Витальевичу Доненко**;

доктору медицинских наук, ведущему научному сотруднику лаб. терапевтических вакцин НИИВС им. И. И. Мечникова **Ирине Борисовне Семеновой**.

# Содержание

<b>Список сокращений</b> .....	9
<b>Предисловие</b> .....	11
<b>ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА</b> .....	13
1.1. Основные положения современной концепции врожденного иммунитета .....	13
1.2. Универсальная стратегия распознавания микроорганизмов эффекторами врожденного иммунитета .....	16
1.2.1. Образ распознающие рецепторы эффекторов врожденного иммунитета .....	18
1.2.2. Патоген-ассоциированные молекулярные образы — лиганды рецепторов эффекторов врожденного иммунитета .....	24
1.2.3. Сигналы Toll-подобных рецепторов и роль молекулы MyD88 .....	30
<b>ГЛАВА 2. КЛЕТочНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ</b> .....	35

<b>ГЛАВА 3. КЛЕТОЧНЫЕ СЕНСОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА</b> .....	<b>44</b>
3.1. Дендритные клетки — связующее звено между врожденным и адаптивным иммунитетом .....	44
3.2. Влияние иммуномодуляторов микробного происхождения на функциональную активность дендритных клеток. Морфологическая характеристика дендритных клеток на разных этапах созревания .....	50
3.3. Фагоцитарная активность дендритных клеток на разных этапах созревания .....	59
3.4. Характеристика иммунофенотипа зрелых дендритных клеток, полученных при использовании в качестве индуктора созревания иммуномодуляторов микробного происхождения .....	65
3.4.1. Действие иммуномодуляторов микробного происхождения на активацию дендритных клеток, генерированных из мононуклеарных лейкоцитов человека .....	74
3.5. Естественные киллеры .....	82
3.5.1. Естественные киллеры Т-лимфоциты .....	84
3.5.2. Взаимодействие естественных киллеров и дендритных клеток .....	85
3.6. Тучные клетки .....	86
 <b>ГЛАВА 4. ИНСТРУКТИВНАЯ ФУНКЦИЯ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАПРАВЛЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА, КОНТРОЛЬ ЗА ФОРМИРОВАНИЕМ АДАПТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА</b> .....	 <b>88</b>
4.1. Кросс-презентация .....	94
4.2. Влияние иммуномодуляторов микробного происхождения на антигенпрезентирующую функцию дендритных клеток и образование специфических цитотоксических лимфоцитов .....	95
4.3. Молекулы, участвующие в дифференцировке Т- и В-клеток .....	101
4.4. Характеристика профиля и уровня цитокинов, продуцируемых дендритными клетками, созревших под действием иммуномодуляторов микробного происхождения .....	109

<b>ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ .....</b>	<b>112</b>
5.1. Пролиферативная активность мононуклеарных лейкоцитов под воздействием иммуномодуляторов микробного происхождения .....	112
5.2. Влияние иммуномодуляторов микробного происхождения на цитотоксическую активность естественных киллеров .....	115
<b>ГЛАВА 6. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....</b>	<b>122</b>
6.1. Влияние иммуномодуляторов микробного происхождения на иммунофенотип мононуклеарных лейкоцитов селезенки мышей .....	122
6.2. Влияние иммуномодуляторов микробного происхождения на цитокиновый профиль у мышей .....	126
6.3. Особенности спонтанной и стимулированной продукции цитокинов спленоцитами мышей, вакцинированных Иммуновак-ВП-4 .....	131
6.4. Изучение цитокинового профиля мышей после вакцинации АСО .....	135
<b>ГЛАВА 7. ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....</b>	<b>139</b>
7.1. Торможение роста опухоли и снижение количества метастазов у мышей при введении иммуномодуляторов микробного происхождения .....	139
7.2. Усиление противоопухолевого эффекта мононуклеарных лейкоцитов при одновременном снижении иммуносупрессивного действия цитостатиков под влиянием иммуномодуляторов микробного происхождения .....	147

7.3. Влияние иммуномодуляторов микробного происхождения на цитотоксичную активность МЛ по отношению к линии опухолевых клеток L929 .....	152
<b>ГЛАВА 8. РОЛЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В ФОРМИРОВАНИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО И ПРОТИВОИНФЕКЦИОННОГО ИММУНИТЕТА .....</b>	<b>156</b>
8.1. Противоопухолевая активность дендритных клеток .....	157
8.2. Противовирусная активность дендритных клеток .....	161
<b>ГЛАВА 9. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ АКТИВАЦИИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА .....</b>	<b>166</b>
9.1. Способность иммуномодуляторов микробного происхождения создавать экспресс-защиту от гетерологичного патогена ( <i>S. typhimurium</i> ) и оценка цитокинового профиля у мышей .....	166
9.2. Многомерный факторный и регрессионный анализ клеточных и цитокиновых событий у зараженных <i>S. typhimurium</i> мышей после иммунизации .....	171
9.3. Использование дендритных клеток для создания защиты от инфекции (на модели <i>K. pneumoniae</i> ) .....	179
9.4. Использование лимфокин-активированных киллеров для формирования экспресс-защиты от инфекции (на модели <i>K. pneumoniae</i> K2) .....	183
<b>ГЛАВА 10. РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА И ОГРАНИЧЕНИЕ ИММУНОПАТОЛОГИЙ .....</b>	<b>189</b>
10.1. IL-10-продуцирующие натуральные CD4 <sup>+</sup> Tregs и толерогенные дендритные клетки .....	189
10.2. Th1 и Th2 типы клеток — разнонаправленные эффекторы иммунитета .....	192
10.3. Другие регуляторные цепи .....	193
10.4. IL-10 и сдерживание иммунного ответа .....	193
10.5. Роль IL-10 в развитии инфекционных заболеваний и маневрах ускользания патогена .....	195

10.6. Являются ли IL-10-Tregs и N-Tregs союзниками? .....	197
10.7. Защита против иммунопатологических эффектов .....	200
10.8. Ограничение повреждений .....	201
<b>ГЛАВА 11. УСКОЛЬЗАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ</b> <b>ОТ ИММУННОГО ОТВЕТА</b> .....	<b>202</b>
11.1. Стратегии микробов в преодолении врожденного иммунитета .....	203
11.2. Проникновение в клетку .....	206
11.3. Экстраклеточные микробы и Toll-сигналы .....	207
11.4. Манипуляция бактерий TLR-каскадом реакций .....	209
11.5. Внутриклеточные бактерии взаимодействуют с NOD .....	210
11.6. Влияние патогенов на конвергирующие сигналы TLRs и NODs .....	211
11.7. Манипуляция врожденным иммунитетом — сбой иммунных реакций .....	212
11.8. Антимикробные пептиды — барьеры для проникновения микробов .....	213
11.9. Сдерживание функций протеасом хозяина .....	214
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	<b>217</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>220</b>



## Список сокращений

- АПК — антигенпредставляющая клетка  
АСО — анатоксин стафилококковый очищенный  
ВП-4 — поликомпонентная вакцина из антигенов условно-патогенных микроорганизмов «Иммуовак-ВП-4»  
ГМДП — N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамоил-дипептид (L-аланил-D-изоглутамин)  
ДК — дендритная клетка  
ИММП — иммуномодуляторы микробного происхождения  
ЛАК — лимфокинактивированные киллеры  
ЛПС — липополисахарид  
МЛ — моноклеарные лейкоциты  
МЛПК — моноклеарные лейкоциты периферической крови  
РНК — рибонуклеиновая кислота  
ФГА — фитогемагглютинин  
СрG — олигодезоксинуклеотид цитозин-полигуанин  
CTL — цитотоксические Т-лимфоциты  
ds RNA (double straight RNA) — двуспиральная РНК  
ERK (extracellular signal-regulated kinase) — киназа, регулирующая внутриклеточные сигналы  
Fc-фрагмент (fragment crystallizable — фрагмент кристаллизуемый) — фрагмент иммуноглобулина  
GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор  
HLA (human leucocyte antigens) — антигены главного комплекса гистосовместимости человека  
IFN — интерферон  
Ig — иммуноглобулин

IL — интерлейкин

M-CSF (macrophage colony stimulating factor) — макрофагальный колониестимулирующий фактор

MHC (major histocompatibility complex) — главный комплекс гистосовместимости

NF- $\kappa$ B (nuclear factor) — ядерный фактор  $\kappa$ B

NK (natural killers) — естественные киллеры

NKT-клетки — естественные киллеры Т-лимфоциты

NOD (nucleotide binding oligomerization domain) — нуклеотид-связывающий олигомеризующий домен

PAMPs (pathogen associated molecular pattern) — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (структуры)

PRRs — (pattern recognition receptor) паттерн-распознающие рецепторы

ssRNA (single straight RNA) — одноцепочечная РНК

TCR (T-cell receptors) — антигенраспознающие рецепторы Т-лимфоцитов

Th1/Th2 — Т-хелперы I и II порядка

TLR (toll like receptor) — олл-подобный рецептор

TNF (tumor necrosis factor) — фактор некроза опухолей

МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид

CD (cluster of differentiation) — кластер дифференцировки

CXCR — рецептор СХС-хемокинов ( $\alpha$ -хемокинов)

CCR — рецептор СС-хемокинов ( $\beta$ -хемокинов)

## Предисловие

**П**рогресс экспериментальной биологии обусловил прорыв в исследованиях клеточных и молекулярных механизмов иммунитета. Это относится в первую очередь к пересмотру ранее сложившихся представлений о роли врожденного иммунитета в общей системе иммунитета. Получены новые фундаментальные данные о соотношении эффекторных функций врожденного и адаптивного иммунитета. Установлено, что система врожденного распознавания осуществляется с помощью специфических, наследственно закодированных рецепторов (PRRs), которые взаимодействуют с консервативными патоген-ассоциированными молекулярными структурами микроорганизмов (PAMPs). Установлена многофакторность эффекторных механизмов врожденного иммунитета, заключающаяся не только в немедленном сдерживании инфекционного агента и его репликации при проникновении в организм, но и в том, что она играет важнейшую роль в представлении антигенов Т-лимфоцитам и осуществлении инструктивной функции, определяя направленность развития адаптивного иммунитета. В настоящее время довольно четко определены клеточные и молекулярные пути взаимодействия между врожденным и адаптивным иммунитетом, и показано, что ключевыми эффекторами в реализации инструктивной функции врожденного иммунитета являются дендритные клетки. Они осуществляют распознавание, процессинг в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости.

Новый взгляд на роль врожденного иммунитета в естественной и приобретенной невосприимчивости к инфекции открывает перспективы более целенаправленного управления этим процессом с помощью вакцин, иммуномодуляторов и других фармацевтических препаратов. Однако для этого необходимы фундаментальные исследования по

установлению действия этих препаратов, имеющих иммуностропное действие; особое место занимают иммуномодуляторы микробного происхождения, содержащие в своем составе PAMPs, являющиеся лигандами для паттерн-распознающих рецепторов на клетках-эффекторах врожденной иммунной системы. Молекулярно-клеточные механизмы действия этих препаратов изучались фрагментарно в отношении лишь некоторых из них. Фактически отсутствуют данные о влиянии иммуномодуляторов на показатели активности дендритных клеток, а между тем они определяют важнейшие этапы развития и взаимосвязи между врожденным и адаптивным иммунитетом, в том числе направленность дифференцировки Т-лимфоцитов. В работе обобщены данные литературы, отражающие современные представления о роли врожденной иммунной системы и функциональной активности ключевых ее эффекторов, а также результаты собственных исследований авторов, сосредоточенные на молекулярных и клеточных механизмах действия иммуномодуляторов микробного происхождения на всех этапах становления врожденного и адаптивного иммунитета. Установлено, что исследованные иммуномодуляторы (поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4, ГМДП и анатоксин стафилококковый очищенный) являются индукторами созревания ДК, этот процесс сопровождается усилением экспрессии костимулирующих молекул, молекул антигенного представления и широкого спектра цитокинов. При действии иммуномодуляторов ДК усиливают антигенпрезентирующую активность, что было установлено по способности предъявлять опухолевые антигены Т-лимфоцитам, дифференцирующимся при этом в цитотоксические эффекторы; по защите от инфекции при адаптивном переносе нагруженных антигеном ДК. Выявлена разная степень выраженности этих процессов при действии указанных иммуномодуляторов. Важным аспектом исследований явились также данные о степени их противоопухолевой активности и снижения супрессивного действия цитостатиков, что обуславливает перспективность разработки схем и методов их применения в рамках комплексной терапии опухолей.

Установленные механизмы действия иммуномодуляторов микробного происхождения позволяют также определить стратегию их дифференцированного применения при аллергопатологии и других иммунопатологических состояниях.

Приведенные в книге материалы могут быть полезными для иммунологов, работающих в области молекулярной биологии, студентов медицинских вузов.

*Заслуженный деятель науки РФ, доктор  
медицинских наук, профессор Н. Б. Егорова.*

Таблица 1

**Различия между врожденным и приобретенным иммунитетом**

[149]

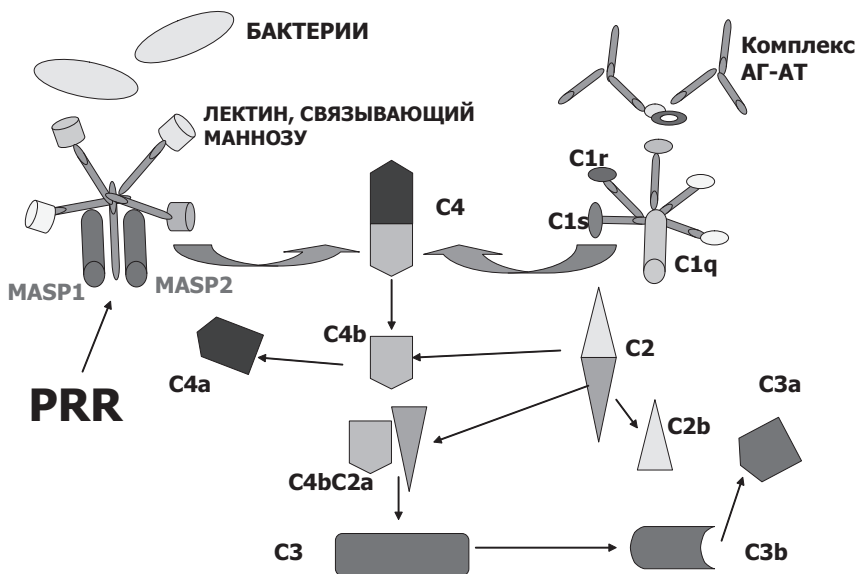
Различия	Врожденный иммунитет	Приобретенный иммунитет
Система распознавания: рецепторы	Сформированы в процессе эволюции	В результате реаранжировки генов
Патогенные структуры	PAMPs Неизменные структуры Представлены на широкой группе патогенов	Специфические домены, представленные на одном патогене
Эффекторные функции	Неспецифический цитокин-зависимый иммунитет клеток против вирусов, бактерий и опухолей Цитотоксичность NK, макрофаги, ДК и комплемент Продукция цитокинов (IFNs, TNFs), лимфокинов, хемокинов Фагоцитоз, кислородный взрыв Продукция естественных IgM неизвестной специфичности	Продукция специфических антител Цитотоксичность, зависящая от МНС Цитотоксичность, зависящая от комплемента и антител Продукция цитокинов
Клетки	Макрофаги, ДК, $\gamma\delta$ T-клетки, В-1 $\alpha$ , нейтрофилы	АПК, В-лимфоциты, Т CD4 <sup>+</sup> , Т CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты

многоклеточных организмов может вырабатываться адаптивный иммунный ответ на патоген [329, 509].

Эффекторная система врожденного иммунитета многофакторна (табл. 1), к ней относят: барьерную функцию кожи и слизистых; гуморальные факторы (система комплемента, лизоцим, растворимые белки — С-реактивный белок, сурфактанты, дефензины и др.); клеточные элементы (естественные киллеры, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы и др.) [85, 218, 158].

До последнего времени врожденный иммунитет рассматривали, прежде всего, с позиций первой линии защиты от инфекционных патогенов и других чужеродных структур или опухолевого роста. В последние десятилетия получены новые фундаментальные данные о роли врожденного иммунитета. Выявлено несколько ключевых положений, определяющих механизм и значение врожденного иммунитета в системе создания невосприимчивости к инфекции и поддержания гомеостаза организма [223, 153]. Такими ключевыми положениями являются:

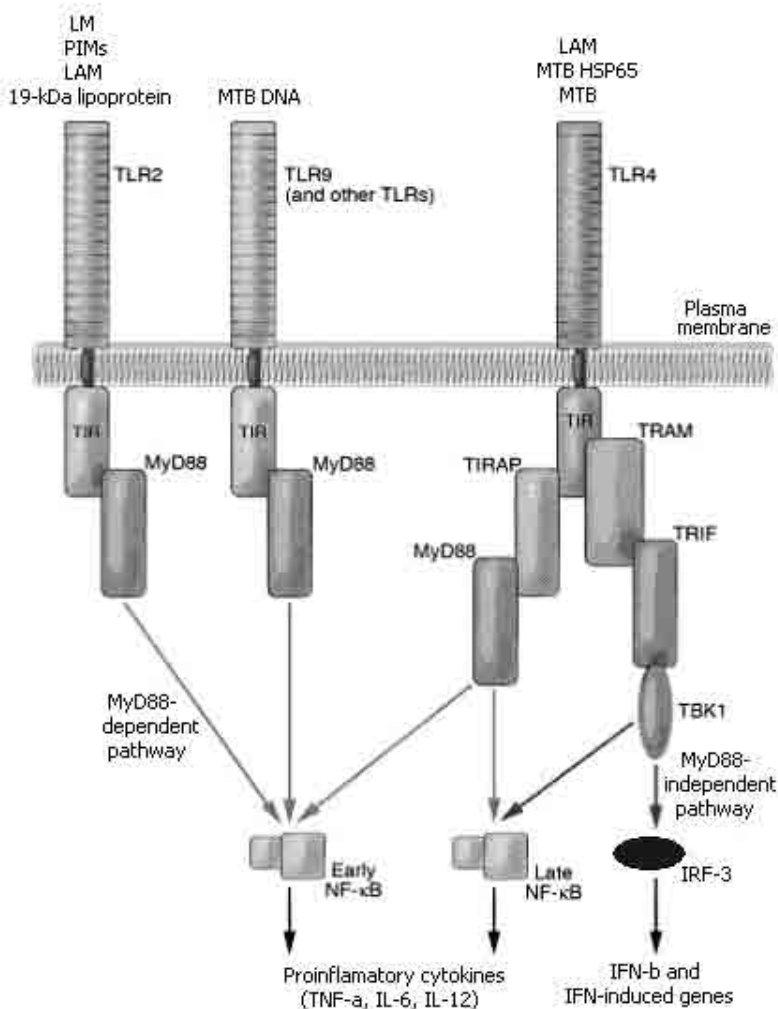
- универсальная стратегия распознавания клетками врожденного иммунитета патогенассоциированных молекулярных структур (pathogen-associated molecular patterns — PAMPs) микроорганизмов;
- выявлены ранее неизвестные функции *дендритных клеток* (процессинг и представление антигена, продукция цитокинов) [101,



**Рис. 1. Лектиновый путь активации комплемента**

лектинов, который связывается с микробными углеводами и инициирует лектиновый путь активации комплемента. Маннансвязывающий лектин синтезируется в печени и выделяется в сыворотку как компонент ответа острой фазы иммунного ответа. Он может связываться с углеводами грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей, некоторых вирусов и паразитов [215, 517]. Сериновые протеазы 1 и 2, ассоциированные с маннансвязывающим лектином (Masp1 и Masp2), подобно протеазам классического пути активации комплемента C1r и C1s, при активации приводят к расщеплению C3 и активации C3 конвертазы, что в результате усиливает каскад активации комплемента (рис. 1.) [240]. Однако, протеазы маннансвязывающего лектина активируются при связывании с микробным лигандом, в отличие от C1 протеазы, для активации которой необходим комплекс антигена с антителом [52].

**Эндоцитозные PRRs** локализуются на поверхности фагоцитов. После распознавания PAMPs микробов PRRs опосредуют поглощение патогена и его доставку к лизосомам для расщепления. Процессированные пептиды представляются молекулами MHC на поверхности макрофага Т-лимфоцитам. К эндоцитозным PRRs принадлежит маннозный рецептор макрофага, распознающий терминальную маннозу и остатки



**Рис. 2. MyD88-зависимый и MyD88-независимый TLR сигнальные пути.**

Трансдукция большинства TLRs-сигналов осуществляется при помощи адаптерного белка MyD88; однако, TLR4 может передать сигналы, опосредованные альтернативными адаптерами, TRAM and TRIF. Подобно MyD88, этот путь может активировать NF-κB, но может регулировать транскрипцию генов-мишеней, отличающуюся от классического MyD88-зависимого пути. HSP65 — белки теплового шока 65; LAM — липоарабиноманнан ; LM — липоманнан; PIMs — фосфатидил-инозитол маннозидазы; STF — растворимый туберкулезный фактор (soluble tuberculosis factor); TIRAP — TIR доменсодержащий адаптер [106]

Таким образом, иммунофенотипически и функционально различающиеся типы ДК, образующиеся из различных гемопоэтических предшественников и локализующиеся в разных тканях и органах, образуют единую систему клеточных популяций, распознающих и представляющих антигены Т- и В-лимфоцитам или формирующих у них толерантность к аутоантигенам [39, 89, 400].

Отличительной чертой ДК от других АПК (макрофаги, тучные клетки, В-лимфоциты) является то, что стимулирующий эффект ДК на Т-лимфоциты во много раз (10–100) сильнее других АПК. Во-вторых, ДК являются единственными антигенпрезентирующими клетками, способными представлять наивным Т-клеткам неизвестные антигены и усиливать иммунный ответ [112, 125]. Мощный потенциал ДК стимулировать Т-клеточный ответ осуществляется благодаря их способности экспрессировать:

1) от 10 до 100 раз активнее комплекс МНС-пептид на своей поверхности по сравнению с другими АПК [296, 297];

2) адгезивные молекулы ДК, способствующие усилению взаимодействия между антигенспецифическими МНС и TCR [154, 278];

3) костимулирующие молекулы, активирующие наивные и покоящиеся Т-клетки в эффекторные Т-клетки [296, 297]. ДК могут активировать Т-клетки путем проведения антигенспецифических стимулов (через МНС-TCR взаимодействия) и костимулирующих сигналов (через акцессорные контакты) [342, 639];

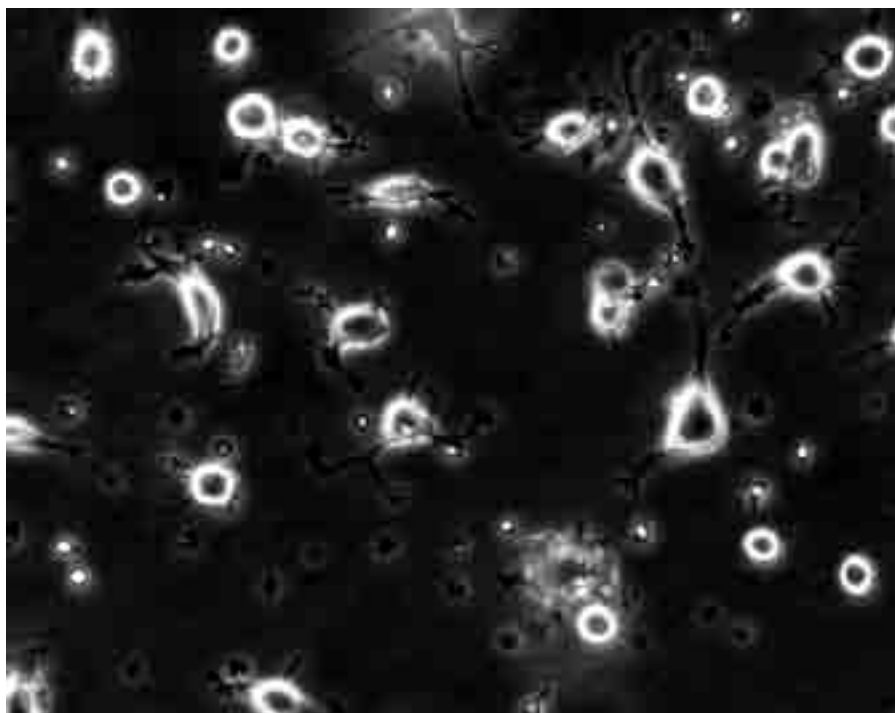
4) мощные регуляторные цитокины, такие как IL-12, усиливающие естественную резистентность организма благодаря индукции и активации NK-клеток и Т клеток.

Удивительная пластичность плазмацитоидных пре-DCs отличает их от других клеточных типов иммунной системы, имеющих ограниченные функции, и свидетельствует о том, что эти клетки могут играть ключевую роль в интеграции врожденного и адаптивного иммунного ответа [345, 346, 386, 409].

### **3.2. Влияние иммуномодуляторов микробного происхождения на функциональную активность дендритных клеток. Морфологическая характеристика дендритных клеток на разных этапах созревания**

Фазово-контрастная микроскопия ДК, полученных в лабораториях клеточного иммунитета РОНЦ им. Н.Н. Блохина и терапевтических вакцин НИИ им. И.И. Мечникова РАМН из клеток костного мозга и клеток эмбриональной печени мышей, выявляла звездчатые клеточные формы с характерными цитоплазматическими отростками, что соответствует описанию ДК другими исследователями [412, 615] (рис. 3).





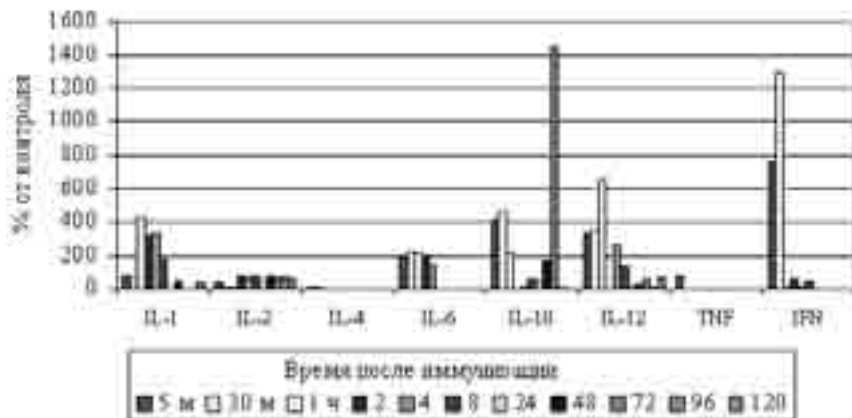
**Рис. 3. Дендритные клетки, генерированные из клеток-предшественников костного мозга мышей СВА, в культуре на 9-е сутки (3 сутки после обработки Иммуновак-ВП-4, 25 мкг/мл).**

Микрофотография дендритных клеток при фазово-контрастной микроскопии культуральной взвеси, ок. 10, об. 40

Морфологическую характеристику ДК изучали совместно с д-ром. мед. наук О.В. Лебединской. Клетки, прилипшие к пластику культурального флакона, имели вуалевидный характер с многочисленными длинными тонкими отростками на поверхности (рис. 4).

Клетки при культивировании в течение семи суток без внесения в культуральную среду индукторов созревания характеризовались нежной цитоплазмой вуалевидного характера, при активации ДК иммуномодуляторами микробного происхождения (ИММП), а также TNF- $\alpha$ , приобретали многочисленные отростки, характерные для зрелых клеток (рис. 5). При этом цитоплазма становилась более плотной.

Электронномикроскопические исследования показали, что во взвеси ДК, генерированных как из клеток костного мозга, так и из клеток эмбриональной печени мышей, выявляются типичные электронномикроскопические признаки зрелых дендритных клеток — наличие многочисленных



**Рис. 37. Спонтанная индукция цитокинов в культуре спленоцитов мышей линии СВА, иммунизированных Иммуновак-ВП-4.**

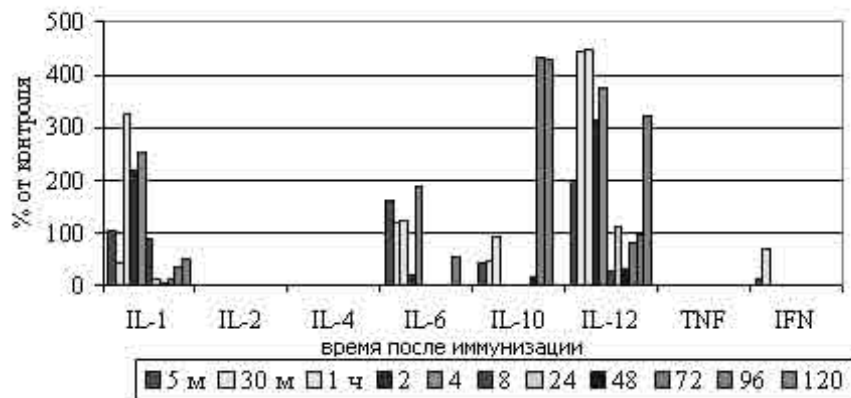
По оси ординат — уровень цитокинов в % от уровня интактных мышей

IL-12 в интервале 4–24 часа, IFN- $\gamma$  — в интервале 4–8 часов. Через 48 часов только IL-12 выявлялся в значительных количествах.

Было также изучено влияние бактериальной инфекции, вызванной *S. typhimurium*, на цитокиновый статус мышей линии СВА (рис. 36). Мышам внутрибрюшинно вводили сублетальную дозу штамма *S. typhimurium* 415 ( $10^3$  микробных клеток) в 0,5 мл физиологического раствора. При инфекции в сыворотках регистрировали повышенную концентрацию IL-6, IL-12 и IFN- $\gamma$ , однако эти события происходили значительно позже, чем при вакцинации. Увеличение содержания IL-6 и IFN- $\gamma$  отмечено только через 24 часа после введения патогена, IL-12 через 48 часов. Высокие уровни этих трех цитокинов сохранялись в течение 120 часов (срок наблюдения), тогда как у вакцинированных мышей в этот срок уровни цитокинов были в таких же пределах, как у интактных животных.

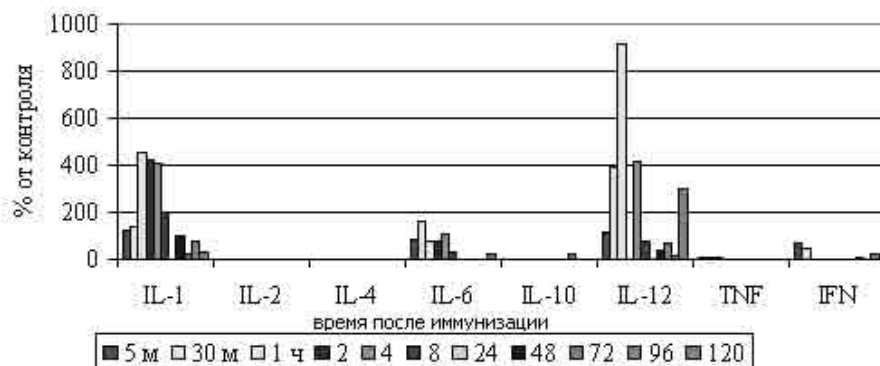
### 6.3. Особенности спонтанной и стимулированной продукции цитокинов спленоцитами мышей, вакцинированных Иммуновак-ВП-4

В настоящем разделе работы была изучена продукция цитокинов клетками селезенки вакцинированных мышей линии СВА в культуре. Спленоциты ( $2 \times 10^6$  кл/мл) инкубировали в ростовой среде в течение 72 часов при добавлении Иммуновак-ВП-4 (12,5 мкг/мл) или ФГА (10 мкг/мл),



**Рис. 38.** Индукция цитокинов в культуре спленоцитов мышей линии СВА, иммунизированных Иммунавак-ВП-4, при добавлении в культуру Иммунавак-ВП-4 (12,5 мкг/мл).

По оси ординат — уровень цитокинов в % от уровня интактных мышей



**Рис. 39.** Индукция цитокинов в культуре спленоцитов мышей линии СВА, иммунизированных Иммунавак-ВП-4, при добавлении в культуру ФГА (10 мкг/мл).

По оси ординат — уровень цитокинов в % от уровня интактных мышей

### 10.6. Являются ли IL-10-Tregs и N-Tregs союзниками?

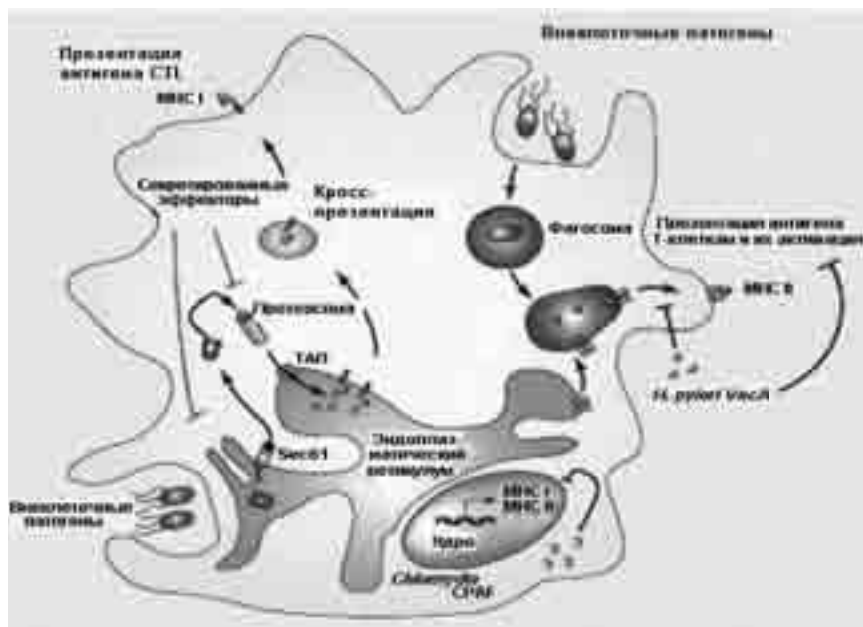
Из IL-10-продуцирующих Т-клеток, реагирующих на инфекционный патоген, выделяют следующие типы: Th1, Th2, CD8<sup>+</sup> Т-клетки [453, 492, 632, 633] и Tregs [137, 157, 652]. Первоначально было установлено, что IL-10-Tregs и N-Tregs участвуют в регуляции аутоиммунной и воспалительной патологии [421, 492]. Позже было установлено, что они также модулируют ответ на инфекционные патогены. Выявлено, что IL-10-Tregs сдерживают ответ *in vitro* Т-клеток на антигены *Micobacterium tuberculosis* у человека [157, 203]. У мышей с гепатитными инфекциями IL-10-Tregs играют критическую роль в регуляции иммунного ответа при колитах [390]. Также было показано, что натуральные CD25<sup>+</sup> Tregs у мышей, инфицированных *L. major*, регулируют иммунный ответ на патоген через продукцию IL-10 [137].

Натуральные Tregs сдерживают развитие воспалительной иммунной патологии и аутоиммунных заболеваний через их способность управлять численностью Т-клеток *in vivo* и манипуляции цитокинами [369, 421]. Специфические механизмы, используемые N-Tregs для их супрессирующей функции, могут запустить контактно-клеточные механизмы с еще неидентифицированной молекулярной структурой, экспрессию CTLA4, цитокинов, включая IL-10 и TGF-β [120, 555, 577, 421, 498, 605, 606] или, как установлено позднее, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [276]. Некоторые механизмы, посредством которых N-Tregs могут ингибировать аутореактивные иммунные механизмы или воспалительные реакции, направлены на ограничение иммунного ответа на патогены [137, 157, 390] с целью предотвращения развития иммунной патологии.

Способность управлять численностью лимфоцитов [369, 421] и силой иммунного ответа является важной особенностью организма в эффективной борьбе с инфекцией с ограничением вторичной иммунопатологии. Однако иммуносупрессия, индуцированная патогеном, обеспечивает стратегию ускользания микроорганизма от иммунного ответа.

IL-10-Tregs могут быть индуцированы при определенных экспериментальных условиях стимуляции антигеном *in vitro* и *in vivo* [176, 652], а также в естественных условиях при инфицировании организма [137, 157, 389, 421, 453, 492]. Кроме того, IL-10 может продуцироваться *in vivo* при введении растворимого белкового антигена, индуцирующего анергию/толерантность [176, 531, 602, 652].

Sundstedt et al. (2003) продемонстрировали, что IL-10-Tregs активируются при повторном интраназальном введении антигенного пептида основного белка миелина и, эти регуляторные клетки ингибируют пролиферацию наивных миелин-специфичных Т-клеток *in vitro* и *in vivo*.



**Рис. 59. Влияние патогенов на адаптивный иммунитет через активацию механизмов врожденного иммунитета [191]**

NF-κB. При таких инфекционных процессах может наблюдаться быстрая и эффективная экспрессия, а также доставка факторов вирулентности в клетки хозяина, что приводит к деактивации TLR и NOD-сигналов некоторыми патогенами.

### **11.7. Манипуляция врожденным иммунитетом — сбой иммунных реакций**

Несмотря на существование многочисленных бактериальных патогенов и выработанный ими путь использования секретируемых белков с целью ускользания от распознающего действия врожденной иммунной системы, в организме осуществляется бесконечная работа часовых иммунитета.

Активация распознающей системы иммунитета является неизбежной благодаря функциональной пластичности иммунных клеток, вовлеченных в инфекционный процесс, даже при наличии огромного избытка стратегий ускользания от иммунного надзора. Так, некоторые патогены, обитающие внутри клетки, обладают способностью нейтрализовать или модифицировать сигнальные пути активации врожденного иммунитета, но не абсолютно уклоняться от иммунного ответа (рис. 59).