

МАМОНТОВ
Андрей Сергеевич

**ОПОСРЕДОВАННАЯ IgG ДЕГРАГУЛЯЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ
ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ЕЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ**

3.3.3. Патологическая физиология
3.2.7. Иммунология

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт-Петербург
2024 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Институт экспериментальной медицины»

Научные руководители:

Полевщиков Александр Витальевич, доктор биологических наук, профессор

Дешева Юлия Андреевна, доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Колесникова Наталья Владиславовна – доктор биологических наук, профессор, профессор каф. Клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Кубанский государственный медицинский университет" Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Сесь Татьяна Павловна – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П.Павлова

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

Защита состоится «___» _____2024 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский проспект, д. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д.12 и на сайте <https://iemspsb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «___» _____2024 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
доктор биологических наук, доцент

Алешина Галина Матвеевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Роль тучных клеток и их секреторных продуктов в развитии воспаления является предметом патофизиологических и иммунологических исследований свыше 100 лет. В последние 30 лет наблюдается неуклонный рост числа публикаций, посвященных роли ТК в патогенезе вирусных инфекций, в том числе гриппа, при этом общее число работ, посвященных свойствам и функциям ТК составляет от 1000 до 1500 статей в год (Гусельникова В.В., Полевщиков А.В., 2021). Наиболее распространенный подход к изучению роли ТК при воспалении связан с наличием на их поверхности Fcε-рецепторов, через которые осуществляется связывание сывороточного IgE и сенсibilизация ТК, ярко проявляющаяся в реакциях гиперчувствительности немедленного типа (Prussin C., Metcalfe D. D., 2006). В 1997 году было установлено, что Fcγ-рецепторы на мембране ТК также могут играть важную роль в патогенезе инфекционного воспаления вирусной природы, сопутствующей альтерации тканей и определении исхода процесса (Miyajima I. et al., 1997; Lee D. M. et al., 2002; Malbec O., Daéron M., 2007). В определенных ситуациях антитела к вирусам могут усиливать вирусные инфекции. Об этом явлении, которое теперь называют антителозависимым усилением вирусных инфекций (ADE), впервые было сообщено в 1964 году (Hawkes R., 1964). В дальнейшем круг вирусных инфекций, при которых были описаны случаи ADE, неуклонно расширялся. Так, в 2008 г. было показано, что ТК могут участвовать в формировании ADE в случае лихорадки Денге, и развитие этого синдрома существенно осложняет течение инфекционного процесса (Boonnak K. et al., 2008). Развитие ADE было отмечено и при COVID-19 (Ricke D. O., 2021).

Несмотря на многолетнюю историю изучения и значительный массив накопленных данных, многие аспекты функционирования Fcγ-рецепторов тучных клеток остаются малоизученными. Это связано как с гетерогенностью Fcγ-рецепторов на поверхности ТК, различиями в их паттернах между ТК и циркулирующими базофилами крови, а также с вкладом иммунных комплексов, содержащих разные подклассы IgG, в процессы активации и дегрануляции ТК. Малоизученными остаются многие аспекты ответных реакций ТК на различные штаммы вируса гриппа, различающиеся не только по традиционным маркерным молекулам гемагглютинаина и нейроминидазы, но и по патогенности штаммов, поскольку сегодня внимание исследователей направлено не только на повышение эффективности вакцин, но и на выяснение причин заболеваемости вакцинированных лиц, среди которых все чаще регистрируются случаи тяжелого и даже летального развития инфекции.

Степень разработанности темы исследования. Тучные клетки синтезируют и накапливают в гранулах множество биологически активных веществ и медиаторы хронического воспаления, а также факторы ремоделирования тканей (протеазы, факторы роста) (Agier J. et al., 2018). Компоненты гранул ТК классифицируются по функциональным характеристикам (Forsythe P., 2019), при этом ТК человека обычно классифицируются в зависимости от содержания триптаза и химаза в их гранулах.

Помимо провоспалительного действия, тучные клетки обладают способностью модулировать иммунологические реакции, например, путем продуцирования противовоспалительного цитокина IL-10 или путем разрушения цитокинов протеазами, высвобождающимися из гранул (Erjefält J. S., 2014). Основываясь на индуцированной способности ТК синтезировать как провоспалительные цитокины, так и различные факторы роста, существуют предложения разделить ТК на провоспалительные и противовоспалительные по аналогии с популяциями макрофагов (Huber M. et al., 2019). В любом случае выброс биологически активных веществ из ТК может происходить постепенно, что связано с гомеостатической регуляцией проницаемости микроциркуляторного русла, но в ответ на воздействие внешних патогенов и антигенов гранулы ТК немедленно высвобождаются при дегрануляции клеток. После секреции гранул тучные клетки способны формировать их вновь за счет синтеза матричного белка и компонентов гранул (Dawicki W., Marshall J. S., 2007). Наиболее изученным и часто упоминаемым медиатором является гистамин, который воздействует на нервные структуры непосредственного окружения (афферентные нервы - С-волокна и рецепторы растяжения, эфферентные нервы, рецепторы гистамина), эпителий, гладкие мышцы и сами тучные клетки. Тучные клетки активируются при ответе на гриппозную инфекцию, высвобождая гистамин, воспалительные цитокины и противовирусные хемокины (Hu Y. et al., 2012; Zarnegar V. et al., 2018; Liu B. et al., 2014; Wu H. et al., 2019). Установлено, что ТК могут способствовать патологическим изменениям при инфекциях, вызванных высокопатогенными вирусами гриппа (Hu Y. et al., 2012). ТК инфицируются вирусами гриппа *in vitro*, и сигнальные пути могут различаться в зависимости от подтипа вируса (Huo C. et al., 2019; Wu H. et al., 2019). Стимуляция ТК *in vitro* вирусами гриппа A/H1N1 и A/H3N2 приводила к различным профилям экспрессии цитокинов, хемокинов и противовирусных генов (Ng K. et al., 2019). Дегрануляция ТК при гриппозной инфекции может быть несвязаной с прямым воздействием dsРНК, как показано на модели ее синтетического аналога: полиинозин-полицитидиловой кислоты (Poly I: C) (Kulka M. et al., 2004), но связана с цитокиновым штормом.

Также в литературе имеются сведения об участии ТК в патогенезе вирусных инфекций и развитии синдрома антителозависимого усиления вирусной инфекции на фоне неэффективной вакцинации. Фактором, способствующим развитию ADE, считают "неканонический" механизм презентации антигена, за счет вовлечения в процесс презентации многих клеток, экспрессирующих FcγR. Причиной развития ADE считают механизм облегченного проникновения вируса в комплексе с антителами IgG-класса и/или факторами комплемента в клетки. Имеются также отдельные публикации по оценке эффективности антигистаминных препаратов в профилактике тяжелых случаев поствакцинального течения вирусной инфекции (Shuang Wang et al., 2014).

Целью данной работы стало изучение возможности дегрануляции тучных клеток, опосредованной IgG-содержащими иммунными комплексами, и её патофизиологических последствий в ходе экспериментальной гриппозной инфекции.

Для достижения этой цели были намечены следующие **задачи по работе**:

1. оценить возможность активации и дегрануляции тучных клеток при связывании Fc γ -рецепторов;
2. изучить влияние иммунных комплексов, сформированных вирусами гриппа штаммов A/H5N1 и A/H1N1pdm09 и специфичных к ним IgG, на процесс секреции различных гранул тучных клеток;
3. изучить патофизиологические и морфологические последствия дегрануляции тучных клеток при экспериментальной гриппозной инфекции;
4. оценить последствия введения блокаторов гистаминовых рецепторов в патогенезе экспериментальной гриппозной инфекции.

Научная новизна работы определяется получением экспериментальных доказательств возможности дегрануляции тучных клеток под действием иммунных комплексов, содержащих IgG и вирусы гриппа штаммов A/H5N1 и A/H1N1pdm09. Доказано, что в случае иммунных комплексов, содержащих штамм A/H5N1, ответные реакции тучных клеток сильнее, чем в случае штамма A/H1N1pdm09. Впервые доказано, что механизм запуска дегрануляции тучных клеток отличается для их мембранных рецепторов Fc γ и Fc ϵ , и уровень секреции гистамина при опосредованной ими дегрануляции тучных клеток может взаимно усиливаться. Приоритетный характер носят результаты, согласно которым при модельной гриппозной инфекции секреция гранул тучных клеток, содержащих гистамин и триптазу, находится в реципрокных взаимоотношениях: в ответ на заражение штаммом A/H5N1 уровень секреции гистамина дозозависимо нарастает, а триптазы снижается. Также показано, что в случае этого штамма провоспалительные эффекты гистамина слабо купируются блокаторами гистаминовых H1 (хлоропирамин) и H2 (фамотидин) рецепторов, в отличие от штамма A/H1N1pdm09. Впервые проведен патоморфологический анализ экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной штаммом A/H5N1 в сравнении с пандемическим штаммом A/H1N1pdm09. Доказано, что дегрануляция тучных клеток, индуцированная вирусом A/H5N1 и/или его комплексами с IgG, приводит к слабо купируемой антигистаминными препаратами сливной дегрануляции тучных клеток, к отеку легких, усилению мононуклеарной инфильтрации легочной и перибронхиальной ткани и повышенной смертности экспериментальных животных. В случае инфекционного процесса, индуцированного штаммом A/H1N1pdm09, блокаторы H1 и H2-рецепторов достоверно угнетают дегрануляцию тучных клеток и продукцию гистамина, что сопровождается ослаблением отека легких, их мононуклеарной инфильтрации и резким снижением летальности.

Теоретическая и научно-практическая значимость заключается в получении новых сведений о роли тучных клеток в патогенезе вирусных инфекций на примере

гриппа. Экспериментальные доказательства возможности активации и дегрануляции тучных клеток под действием IgG-содержащих иммунных комплексов позволяют объяснить тяжелое течение инфекции после иммунизации, а также потенциальную опасность вакцинации после перенесенного заболевания. В основе этих имеющих большое практическое значение наблюдений, согласно полученным в работе результатам, могут лежать механизмы антитело-зависимого усиления вирусной инфекции, связанного не только с формированием антител класса IgG после иммунизации и/или перенесенной инфекции, но и запуском воспалительного процесса в результате активации и дегрануляции тучных клеток. Важное практическое значение также имеют результаты работы, показывающие различную эффективность антигистаминных препаратов (на примере блокаторов H1- и H2-рецепторов) в ходе гриппозной инфекции. Результаты доказывают, что уровень дегрануляции тучных клеток зависит не только от их активации, опосредованной Fc γ и Fc ϵ -рецепторами, но и от эффектов самого вируса, проявляющихся, по-видимому, после проникновения вируса гриппа в тучные клетки.

Результаты исследования позволят расширить область приложения "феномена антителозависимого усиления" к патогенезу вирусных инфекций, в частности тяжелых и летальных форм гриппа, при которых поствакцинальные осложнения также могут быть связаны с "антителозависимым усилением" и участием тучных клеток. В практическом отношении результаты работы позволят выявить новую патогенетическую составляющую в развитии тяжелых вирусных инфекций (участие тучных клеток и их активация), требующую особого внимания к группам риска, и откроют новую мишень (в виде тучных клеток и продуктов их активации) для терапевтического и профилактического воздействия с целью предупреждения и лечения тяжелых, опасных для жизни поствакцинальных осложнений при гриппе и других вирусных инфекциях.

Еще одним результатом, имеющим большое теоретическое и практическое значение, является разработка экспериментальной модели вирусной инфекции у мышей, которая позволила получить летальное заболевание при заражении живым патогенным вирусом животных, имеющих низкий уровень иммунной защиты, индуцированный предварительной иммунизацией низкой дозой инактивированного гомологичного вируса. Использованы несколько штаммов вируса гриппа в качестве заражающего вируса и разные варианты иммуногена для иммунизации (инактивированный вирус гриппа, очищенный гемагглютинин). Также на разработанной модели исследован вопрос о значении интервала между иммунизацией и заражением. Большая часть полученных результатов могут быть востребованы в области клинической иммунологии, патологии и патофизиологии инфекционного процесса и вирусологии, а также в соответствующих курсах лекций.

Методология и методы исследования. Проведенное исследование проспективное контролируемое открытое рандомизированное, соответствует

основным методологическим принципам и является самостоятельной научно-исследовательской работой. Методология работы состояла в последовательном применении методов научного познания. В соответствии с целью и поставленными задачами по работе выбраны современные высокоинформативные вирусологические, иммунологические, гистологические и статистические методы.

Предметом исследования явились иммунологические, физиологические и вирусологические показатели лабораторных животных по ходу экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусами гриппа штаммов А/Н5N1 и А/Н1N1pdm09, а также результаты гистологического исследования и выживаемости животных, получавших вакцинопрофилактику и блокаторы гистаминовых рецепторов хлоропирамин и фамотидин. Методология данного исследования базируется на совокупности лабораторных, инструментальных, статистических методов с соблюдением соответствия современным представлениям о важной роли тучных клеток в развитии воспаления в нижних дыхательных путях по ходу гриппозной инфекции. Данное диссертационное исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины" (протокол № 4/19 от 20.06.2019 г.).

Положения, выносимые на защиту

1. Дегрануляция тучных клеток может быть опосредована связыванием как Fcε₁, так и Fcγ₂-рецепторов. Результатом связывания IgG-содержащих иммунных комплексов с тучными клетками является дозозависимая секреция гистамина.

2. Дегрануляция тучных клеток может индуцироваться иммунными комплексами, содержащими вирус гриппа и вирус-специфические антитела класса IgG. Степень дегрануляции и уровень продукции гистамина зависят от штамма вируса гриппа. В случае штамма А/Н5N1 продукция гистамина тучными клетками выше, чем в случае пандемического штамма А/Н1N1pdm09.

3. Накопление высоких уровней противовирусных IgG-антител в результате повторных эпизодов заболевания и/или иммунизаций может приводить к формированию патогенетически значимого пути запуска дегрануляции тучных клеток и альтерации тканей, ведущей к отягчению процесса.

4. Введение комбинации блокаторов гистаминных рецепторов высоко эффективно при инфицировании штаммом А/Н1N1pdm09 и менее эффективно в случае штамма А/Н5N1.

Степень достоверности и апробации результатов исследования.

Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации - протоколам исследований. Достоверность полученных результатов подтверждается большим объемом выборки экспериментальных животных, многократным повторением экспериментов и дублированием наблюдений по каждой точке с использованием широкого спектра современных методов исследования. При анализе полученных результатов определяли средние величины и

среднеквадратическое отклонение ($M \pm \sigma$). Оценку статистической достоверности различий между точками проводили при помощи параметрических и непараметрических методов статистического анализа с использованием компьютерной программы Statistica (версия 6,0). Различия считали достоверными при $p < 0,05$ и менее.

Основные положения работы были представлены на ряде всероссийских и международных конференций, в том числе III Всероссийской научной конференции молодых ученых: проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия (Санкт-Петербург, 12-14 сентября 2016 г.); XII Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 21-28 августа 2017 г.); Международном форуме «Дни вирусологии (Virology Days) –2020» (Санкт-Петербург, 5–7 октября 2020 г.); Всероссийской конференции молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике», посвященной 120-летию со дня рождения академика А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, 15 апреля 2021 г.); Санкт-Петербургской молодежной школе-конференции "Достижения и перспективы в борьбе с инфекционными заболеваниями (грипп, COVID-19) на национальном и международном уровне (Санкт-Петербург, 6-7 сентября 2021 г.).

Публикации по теме работы. По теме диссертации имеется 11 публикаций, в том числе 9 статей и 2 тезисов докладов. Из числа статей 6 работ опубликовано на английском языке в ведущих зарубежных научных изданиях (WoS Q1-Q2), 3 работы - на русском языке. Среди работ в отечественных изданиях все публикации напечатаны в изданиях, входящих в список ВАК РФ, в том числе 1 работа входит в рейтинг SCOPUS.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста, состоит из Введения, обзора литературы по тематике работы (Глава 1), описания материалов и методов исследования (Глава 2), изложения полученных экспериментальных результатов (Глава 3), их обсуждения (Глава 4), а также Заключения, Выводов, списка сокращений и списка использованной литературы, который включает 174 источника (в том числе 8 работ на русском языке и 166 работ на иностранных языках). Работа проиллюстрирована 43 рисунками и 1 таблицей.

Личное участие автора. Планирование, подготовка и проведение экспериментов, ведение экспериментальных животных (в том числе их иммунизация и заражение), получение биологического материала для исследований, отработка и постановка иммуноферментного анализа, оценка содержания гистамина и триптазы в биологических жидкостях и гомогенатах, оценка содержания вирусов гриппа в образцах, подготовка образцов для проведения гистологического исследования и статистическая обработка полученных данных, интерпретация результатов и их обобщение, подготовка текста диссертации и автореферата выполнены автором лично.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант "Дисплей поверхностных антигенов вируса гриппа для оценки противогриппозного иммунитета", № 20-54-

S52006), Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга (грант "Изучение способности тучных клеток мышей к дегрануляции и выбросу гистамина под влиянием IgG-содержащих иммунных комплексов", 2021 г.), а также в рамках государственных заданий ФГБНУ «ИЭМ» "Иммунологические основы защитных реакций организма" (№ гос. регистрации АААА-А19-119022290065-9, 2019-2021 г.) и "Исследование механизмов дифференцировки Т-лимфоцитов и молекулярно-клеточных основ регуляции иммунного ответа для разработки новых технологий клеточной иммунотерапии онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний" (№ гос. регистрации 1021051001314-5, 2022-2024 гг.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Экспериментальные животные. В работе использовали 230 самцов мышей линии СВА массой тела 16-18 г, полученных из питомника "Рапполово". Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ "ИЭМ" при искусственном освещении (12/12 ч) при неограниченном доступе к пище и воде. Условия содержания, экспериментальной работы и вывода животных из эксперимента полностью соответствовали Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986) и российскому законодательству (ГОСТ 33215-2014 "Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными" от 01.07.2016), а также «Правилам лабораторной практики» Минздрава России № 708н от (23.08.2010). На работу с экспериментальными животными в рамках исследования было получено разрешение локального этического комитета ФГБНУ "ИЭМ" (Заключение № 4/19 от 20.06.2019).

Вирусы гриппа. В работе использовали следующие штаммы вируса гриппа, полученные методами обратной генетики с использованием сертифицированных клеточных линий Vero и лабораторных протоколов, предусматривающих конечное введение вакцины человеку: А/Вьетнам/1194/2004(H5N1) NIBRG-14; А/Индонезия/5/2005(H5N1) IDCDC-RG2, полученные из Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), США. Также в работе были использованы штаммы вируса гриппа пандемического подтипа: А/Южная Африка/3626/2013(H1N1)pdm09 и А/Нью Йорк/61/2015 (H1N1)pdm09, полученные из полученные из Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), США.

Получение и оценка активности тучных клеток перитонеального экссудата мышей

Брюшную полость мыши промывали 5 мл ЗФР и собирали экссудат. Экссудаты по каждой группе из 7 животных пулировали, двукратно отмывали избытком ЗФР при охлаждении. Полученные клетки переводили в охлажденный ЗФР, подсчитывали концентрацию ядерных клеток в камере Горяева, ведя одновременный учет концентрации тучных клеток, устанавливая концентрацию ядерных клеток перитонеального экссудата равной 2,22 млн/мл (или 1 млн ядерных клеток в 450 мкл

ЗФР) при доле ТК в среднем 7-10%. Данную рабочую суспензию в дальнейшем считали суспензией клеток перитонеального экссудата, обогащенной тучными клетками.

Иммунизация мышей вирусами гриппа. Инактивированные формальдегидом концентрированные штаммы вируса гриппа А/Вьетнам/Н5N1 или А/Нью Йорк(Н1N1)рdm09 использовали для иммунизации мышей внутримышечно в дозе 20 000 ГАЕ на 1 мл в объеме 0,1 мл.

Реакция гемагглютинации и торможения гемагглютинации (РГА и РТГА). Реакции проводили в 96-луночных круглодонных планшетах (Sarstedt, Германия). Объем 100 мкл аллантоисной жидкости вносили в первые лунки планшета. В остальные лунки вносили по 50 мкл ЗФР и готовили серийные двукратные разведения. После завершения титрования во все лунки вносили по 50 мкл 0,75% взвеси куриных эритроцитов и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Результаты РГА учитывали после полного оседания эритроцитов в контрольных лунках и выражали в виде титра, которым считали последнее разведение аллантоисной жидкости, которое обеспечивало формирование типичного агглютината.

В случае РТГА использовали сыворотки иммунизированных вирусом гриппа мышей, которые предварительно обрабатывали экстрактом нейраминидазы холерных вибрионов (Denka Seiken, Япония). В каждую лунку добавляли стандартную дозу вируса (4 ГАЕ) в объеме 50 мкл. После инкубации в течение 15 мин при комнатной температуре добавляли 50 мкл 0,75% суспензии куриных тест-эритроцитов и инкубацию при тех же условиях продлевали ещё на 30 мин. Титры антигемагглютинирующих выражали как величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, при котором не формировался типичный агглютинат.

Метод оценки дегрануляции ТК. Дегрануляцию ТК индуцировали путем внесения вирусов разных штаммов к нагруженным противогриппозными IgG клеткам перитонеального экссудата с последующей инкубацией в течение 40 мин при 37°C. Оценку степени дегрануляции проводили по высвобождению в супернатант гистамина по методу Шора (Shore et al., 1959). Метод основан на обработке люминесцентного продукта конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом при длинах волн 355/460 нм. Уровень флюоресценции в образцах измеряли в светозащищенных планшетах (Corning-Costar, США) на флюороскане Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL (США) при 355 нм и 450 нм. Параллельно строили калибровочную кривую, используя вместо супернатантов разведения коммерческого гистамина (MP Biomedicals, США). Уровень гистамина в парных образцах каждого супернатанта определяли по калибровочной кривой и выражали в нг/мл.

Оценку концентрации гистамина в тканевых образцах легких мышей с экспериментальной гриппозной инфекцией проводили с помощью наборов EIA Histamine (Beckman Coulter, США) методом конкурентного иммуноферментного анализа. Уровень гистамина в парных образцах каждого супернатанта определяли по калибровочной кривой и выражали в нг/мл.

Оценка роли тучных клеток при гриппозной инфекции

Сыворотки крови мышей, иммунизированных внутримышечно инактивированным штаммом вируса гриппа А/Вьетнам/Н5N1 в объеме 0,1 мл отбирали на 7, 12, 14 и 21-й дни после иммунизации и хранили при температуре -20°C до тестирования. После иммунизации вирусом А/Нью Йорк(Н1N1)рdm09 сыворотки крови были получены на 12-й день после иммунизации. Для анализа уровня противовирусных антител против гомологичных и заражающих вирусов использовали РТГА, перед которой сыворотки обрабатывали рецептор-разрушающим ферментом (Denka Seiken, Япония) по описанному ранее методу (Desheva et al., 2006). На 14-й день после иммунизации мышей интраназально инфицировали LD_{50} вируса, которая составляла $10^{4.5}$ эмбриональной инфекционной дозы (EID_{50}) для вируса гриппа А/Индонезия/Н5N1 или 10^5 EID_{50} для вируса А/Южная Африка (Н1N1)рdm09.

Полученные образцы сыворотки крови, содержащей противовирусные IgG - антитела, а также тучные клетки перитонеального экссудата и образцы легких, использовали для оценки уровня гуморального противовирусного ответа, нагрузки тучных клеток IgG-антителами и оценки патоморфологической картины инфекционного процесса.

Имуноферментный анализ был использован для определения уровней сывороточных антител IgG, IgG1, IgG2a и IgG3 против А/Индонезия/Н5N1 (CDC-RG2), а также уровней гистамина и триптазы в надосадках. При этом для оценки продукции IgG, IgG1, IgG2a методом прямого ИФА подбор антител и условий реакции производили самостоятельно, а для оценки уровней гистамина и триптазы использовали коммерческие наборы для непрямого ИФА Mouse Mast Cell Tryptase ELISA Kit производства MyBioSource (США).

Методы гистологического исследования. Для проведения гистологического исследования на 8-й день после инфицирования получали образцы легочной ткани, которые фиксировали с 10%-ном формалине в течение 24 ч при комнатной температуре. По завершении фиксации производили заключение тканевого блока в парафин по стандартной методике. Срезы толщиной 5-7 мкм депарафинировали и окрашивали стандартными гистологическими красителями, толуидиновым синим для выявления тучных клеток, а также мечеными пероксидазой моноклональными антителами к CD117 (R&D Systems Inc., США).

Оценка влияния антигистаминных препаратов. Для оценки роли гистамина в развитии противовирусного инфекционного процесса части животных внутрибрюшинно вводили смесь блокаторов H1-рецепторов гистамина (хлоропирамин, препарат «Супрастин», Egis, Венгрия) и H2-рецепторов (фамотидин, препарат «Квамател», Gedeon Richter, Венгрия) по 6,7 мг/кг веса тела каждый, в общем объеме 100 мкл. Контролем для них служили соответствующие группы, не получившие блокаторов гистаминовых рецепторов.

Статистические методы. Статистическую обработку полученных данных

проводили с помощью программного обеспечения Statistica версии 6.0 (StatSoft Inc., США). Для построения графиков и определения различий между независимыми группами использовалась Prism 8 (GraphPad, США).

Средние значения и стандартные ошибки средних значений были рассчитаны для представления титров вирусов и других усредняемых нормализованных результатов и представлены в виде $M \pm m$. Титры антител логарифмировали по основаниям 2 или 10 ($\log_2 N$ или $\lg N$), и в дальнейшем результаты представляли в виде $M \pm m$. Все переменные были проверены на нормальность распределения при помощи критерия W-критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения двух независимых групп при отличных от нормального распределений использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Для сравнения нескольких независимых групп использовали тест Крускала-Уоллиса. Во всех случаях как для нормальных, так и для других распределений статистически значимыми считали различия между выборками при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение противогриппозных антител.

Результаты исследования вирус-специфических сывороточных антител в РТГА и ИФА представлены на рис. 1-3. Приведенные на рис.1 результаты показывают, что как для общего IgG, так и его подклассов IgG1 и IgG2a на 12-е сутки после иммунизации наблюдался достоверный прирост уровней IgG в сыворотке крови мышей ($p < 0,05$ и менее во всех случаях).

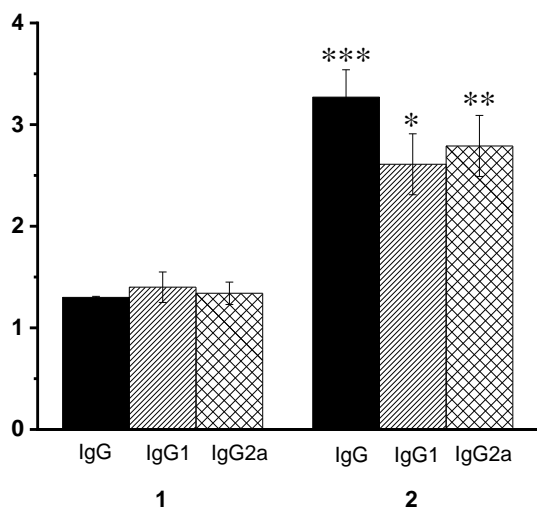


Рис. 1. Уровни IgG и его подклассов в сыворотке крови мышей после иммунизации штаммом вируса гриппа А/Вьетнам/Н5N1 на 12-е сутки после иммунизации по результатам ИФА.

По оси абсцисс: группы, 1 – контроль (введение ЗФР), 2 – штамм А/Вьетнам/Н5N1. По оси ординат: значение титра, $-\lg X$, где X – последнее разведение сыворотки в РТГА, тормозившее гемолиз. $M \pm m$, число наблюдений по каждой точке – не менее 9. Здесь и далее * - различия с контролем достоверны при $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$, *** - при $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента.

Стьюдента.

На рис. 2 приведены результаты изучения динамики IgG-антител против штамма А/Индонезия/Н5N1 после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1. Из приведенных графиков видно, что наиболее быстрый прирост значений титра был связан с подклассом IgG1, наиболее медленный – с подклассом IgG3. Тем не менее, начиная с точки 7 суток, ответ на введение вакцинного штамма обеспечивал достоверные отличия от контроля, которым считали титры изотипов до иммунизации (точка 0 сут).

Важно, что в ответ на введение вакцинного штамма А/Вьетнам/Н5N1 формировались разные изотипы, взаимодействующие со штаммом А/Индонезия/Н5N1, в том числе способные к взаимодействию с различными Fc γ -рецепторами на поверхности тучных клеток.

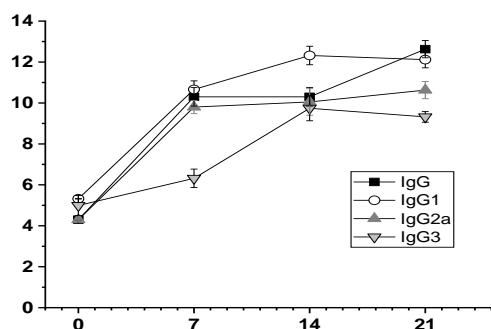


Рис.2. Динамика уровней IgG и его подклассов, специфичных к штамму А/Индонезия/Н5N1, в сыворотке крови мышей после иммунизации штаммом вируса гриппа А/Вьетнам/Н5N1 по результатам ИФА. По оси абсцисс: время эксперимента, сутки; по оси ординат: значение титра, $-\log_2 X$, где X – последнее разведение сыворотки. Обозначения кривых приведены в поле рисунка. $M \pm m$, число наблюдений по

каждой точке – не менее 6.

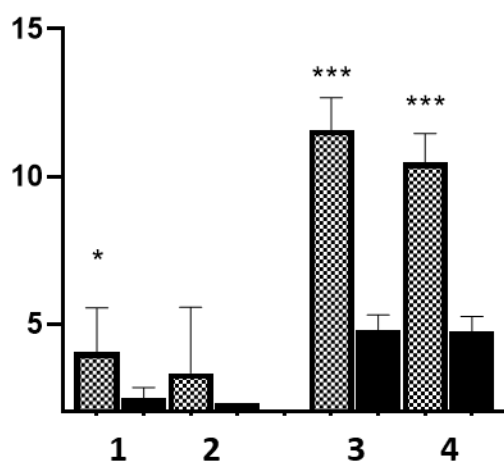


Рис. 3. Уровни антигемагглютинирующих антител по результатам РТГА и вирус-специфических IgG по результатам ИФА на 12-й день после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1. По оси абсцисс: 1 – результаты РТГА к вирусу А/Нью Йорк/Н1N1 pdm09; 2 – результаты РТГА к вирусу А/Южная Африка/Н1N1pdm09; 3 – результаты ИФА к вирусу А/Нью Йорк/Н1N1 pdm09; 4 – результаты ИФА к вирусу А/Южная Африка/Н1N1pdm09. Серый столбик – иммунизация вакцинным штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09, черный столбик – контроль (введение ЗФР). По оси ординат: значение титра, $-\log_2 X$. $M \pm m$, число наблюдений по каждой точке – не менее 6.

наблюдений по каждой точке – не менее 6.

При смене пары вакцинного и инфекционного штаммов со штаммов А/Н5N1 на А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 и А/Южная Африка/Н1N1pdm, соответственно, выявленные по результатам РТГА и ИФА закономерности полностью сохранялись (рис. 7). Титр по IgG в ИФА на 12-й день после иммунизации превосходил титр антител всей суммы разных классов по РТГА, что указывает на преимущественную продукцию антител класса IgG к этому сроку по результатам использованной схемы введения вируса. В любом случае, введение вакцинного штамма А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 обеспечивало достоверный прирост титра противовирусных антител как по результатам РТГА, так и по результатам ИФА.

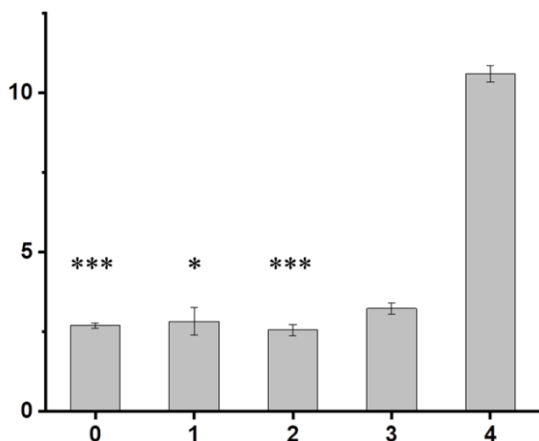


Рис.4. Оценка возможности связывания сывороточных IgG и IgE с рецепторами на поверхности ТК в составе перитонеального экссудата.

По оси абсцисс: 0 – контроль, инкубация ТК с ЗФР, 1 – инкубация ТК с мышьиной антисывороткой к вирусу гриппа штамма H5N1, 2 - инкубация ТК с мышьиной антисывороткой к вирусу гриппа штамма H5N1 с последующим добавлением антисыворотки к мышьиному IgG, 3 – инкубация ТК с антисывороткой к мышьиному IgG, 4 - инкубация ТК с мышьиной

антисывороткой к вирусу гриппа штамма H5N1 с последующим добавлением антисыворотки к мышьиному IgE. По оси ординат: оценка продукции гистамина по методу Шора, усл. ед. Число наблюдений = 5 по каждой точке.

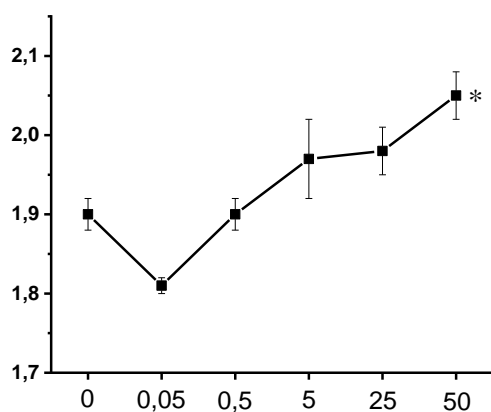


Рис. 5. Оценка продукции гистамина клетками перитонеального экссудата под действием различных концентраций агрегированного IgG.

По оси абсцисс: концентрации иммунных комплексов, сформированных при агрегации IgG мыши, мкг/мл; по оси ординат: продукция гистамина, усл. единицы. $M \pm m$, число наблюдений по каждой точке равно 5.

Доказательства возможности дегрануляции ТК под действием содержащих IgG иммунных комплексов *in vitro*. Возможность дегрануляции ТК под действием иммунных комплексов, содержащих IgG, требует экспериментальных доказательств. Результаты приведены на рис. 4, из которых видно, что IgE несомненно связывается с мембранными Fcε-рецепторами и эффективно проявляется после связывания с анти-IgE-антителами высоким выбросом гистамина (столбец 4). Спонтанный выброс гистамина также имел место (столбец 0), но он усиливался после инкубации клеток перитонеального экссудата с противогриппозной антисывороткой. Выброс гистамина возрастает по сравнению с контролем после добавления противогриппозной сыворотки от вакцинированных мышей (столбец 2, $p < 0,05$ по сравнению со столбцом 0). Однако этот выброс гистамина из ТК практически не отличается от выброса гистамина под действием одних анти-IgG-антител, то есть без потенциального связывания неких вирус-специфичных антител класса IgG с Fcγ-рецептором (столбец 3). Отсутствие достоверных различий между результатами, отраженными в столбцах 2 и 3, подтверждает литературные данные о неспособности мономерного

некомплексированного с антигеном IgG к связыванию с мембранным Fcγ-рецептором.

Результаты, приведенные на рис.5, доказывают выброс гистамина из тучных клеток после их связывания с содержащими IgG комплексами антиген-антитело на примере агрегированного IgG. При переходе от концентрации 0,05 мкг/мл к 50 мкг/мл агрегированных иммунных комплексов, сформированных при прогревании IgG в течение 30 мин при 56°C, продукция гистамина постепенно нарастает, а при концентрации комплексов в 50 мкг/мл различия с контролем становятся достоверными ($p < 0,05$). Этот результат доказывает, что при формировании иммунных комплексов изменяется конформация IgG и появляется возможность взаимодействия с Fcγ-рецепторами на поверхности клеток перитонеального экссудата. Особенно важно, что это связывание приводит к дегрануляции тучных клеток перитонеального экссудата, поскольку только они содержат гистамин в гранулах и способны его секретировать при дегрануляции.

Оценка уровня дегрануляции ТК перитонеального экссудата под влиянием свободных и комплексированных с IgG вирусов гриппа *in vitro*. Иммунный комплекс, сформированных до внесения к клеткам, включал противовирусные IgG-антитела в разных разведениях и специфичный для этих антител антиген (вирусы гриппа А/Вьетнам/Н5N1 или А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 в дозировках 5 и 50 ГАЕ) (таблица). Из приведенных данных видно, что при переходе от дозы вируса 5 ГАЕ к дозе 50 ГАЕ в случае штамма А/Вьетнам/Н5N1 при формировании циркулирующего иммунного комплекса с разведением антисыворотки 1:300 был отмечен высокий выброс гистамина из ТК ($p < 0,01$), сопоставимый с выбросом гистамина, индуцированным внесением анти-IgE-сыворотки.

Таблица

Оценка уровня секреции гистамина ТК перитонеального экссудата *in vitro* под влиянием вирусов гриппа разных штаммов и содержащих их иммунных комплексов, $M \pm m, n = 4$ по каждой точке.

Фактор активации	А/Вьетнам/Н5N1		А/Нью Йорк/Н1N1pdm09	
	5 ГАЕ	50 ГАЕ	5 ГАЕ	50 ГАЕ
Контроль (ЗФР)	3,26 ± 0,89		2,10 ± 0,51	
Вирус	2,56 ± 0,66	2,37 ± 0,37	1,55 ± 0,27	1,47 ± 0,14
АС 1:300	3,76 ± 0,78	3,76 ± 0,78	3,70 ± 1,77	3,70 ± 1,77
АС 1:900	2,08 ± 0,33	2,08 ± 0,33	2,08 ± 0,47	2,08 ± 0,47
Вирус + АС 1:300	4,12 ± 0,39	9,47 ± 0,32**	2,88 ± 0,98	1,63 ± 0,15
Вирус + АС 1:900	3,54 ± 0,68	3,71 ± 0,25	1,54 ± 0,10	3,66 ± 1,77
Анти-IgE-антитела	10,60 ± 0,52		10,30 ± 0,35	

Примечание: АС – мышьяная антисыворотка против соответствующего штамма вируса гриппа.

Важно, что для обоих штаммов вируса гриппа ни одном случае ни сами частицы вируса, ни разведения 1:300 или 1:900 противовирусных мышинных антисывороток не вызывали выброса гистамина, достоверно отличающегося от контроля (таблица).

Оценка уровня дегрануляции ТК в легких в ответ на заражение животных вирусом гриппа. В ходе работы сопоставляли ответные реакции ТК на введение инфекционного штамма вируса гриппа и на тот же штамм вируса на фоне предшествующей иммунизации. Сопоставляемыми параметрами при этом были избраны сывороточные уровни гистамина и фермента гранул ТК триптазы, уровни которых оценивали методом ИФА (рис.6 и 7, соответственно).

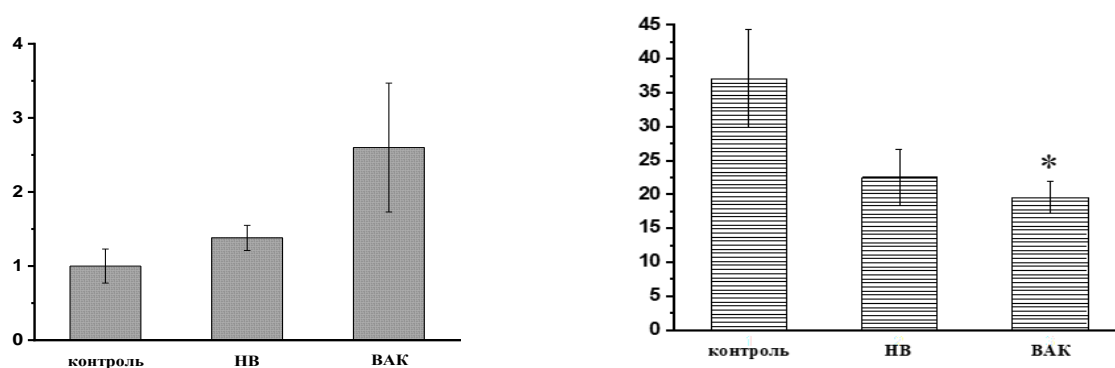


Рис. 6 (слева). Уровень гистамина в сыворотке крови мышей разных групп на 8-й день после инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1.

Рис.7 (справа). Уровень триптазы в сыворотке крови мышей разных групп на 8-й день после инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1.

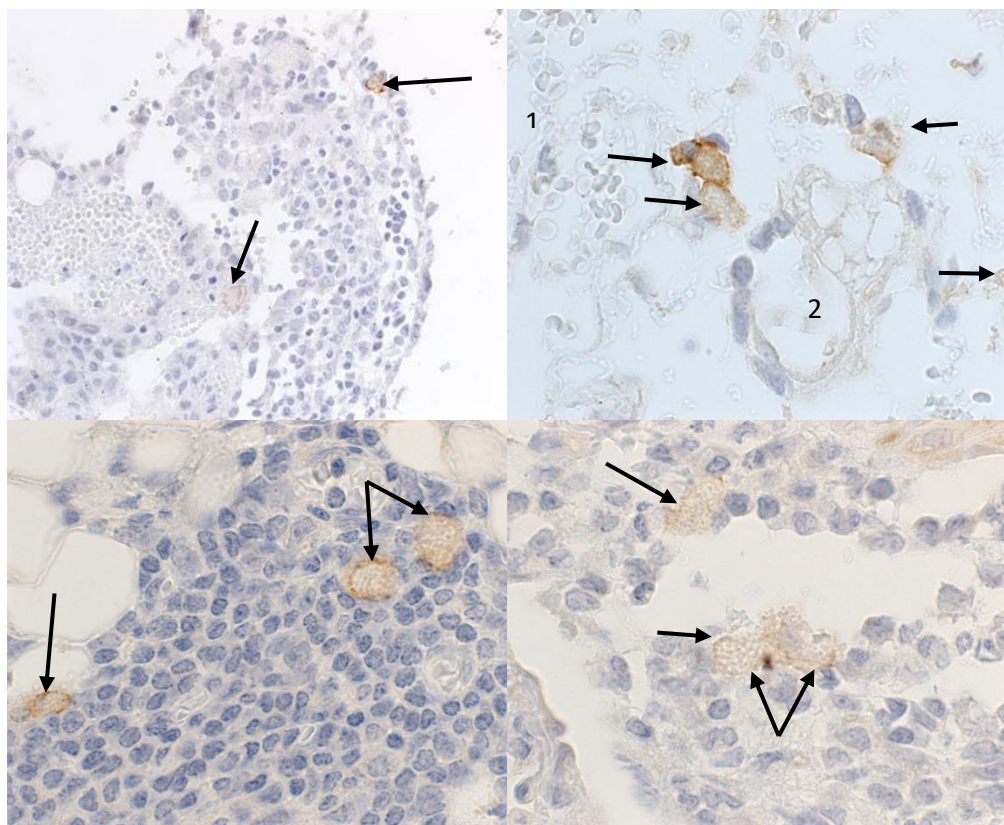
По оси абсцисс: группы, Контроль (интактные животные); НВ – неиммунизированные животные, получившие соответствующий объем ЗФР; ВАК – мыши, иммунизированные штаммом А/Вьетнам/Н5N1 за 14 дней до инфицирования. По оси ординат: концентрация гистамина (триптазы) в сыворотке крови по результатам ИФА, нг/мл. $M \pm m$, число наблюдений по каждой точке – не менее 4.

Если содержание гистамина, связанного с α -гранулами, в сыворотке крови имеет только тенденцию к нарастанию с повышением антигенной нагрузки (рис.6), то при оценке сывороточного уровня триптазы - фермента из δ -гранул тучных клеток были найдены совершенно другие закономерности (рис. 7). Уровень выделения триптазы, фермента, участвующего в ремоделировании межклеточного матрикса, подчиняется принципиально иной закономерности, чем уровень выделения гистамина. Самая высокая продукция триптазы отмечена у мышей контрольной группы в ответ на введение инфекционного штамма ($37,04 \pm 7,21$ нг/мл), а после инфицирования иммунизированных животных ее уровень достоверно снижается до $19,56 \pm 2,31$ нг/мл ($p < 0,05$). Эти различия могут быть связаны с различными сигнальными путями от

мембранных иммуноглобулиновых рецепторов тучных клеток и различным патофизиологическим значением продукции гистамина и триптазы.

Морфологическая оценка уровня дегрануляции ТК в легких в ответ на заражение животных вирусом гриппа.

Участие ТК в инфекционном процессе у иммунных мышей было подтверждено при гистологическом исследовании легких (рис. 8-11).



Иммуногистохимическое окрашивание ТК, локализованных в перибронхиальной области нижних дыхательных путей мыши, антителами против антигена CD117.

Рис.8 (слева сверху). Тучные клетки (стрелки) без признаков дегрануляции. Увеличение 200×.

Рис.9 (справа сверху). Стадия частичной дегрануляции тучных клеток. После иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и последующим введением инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1. Увеличение 400×. 1 – просвет бронха; 2 – просвет сосуда.

Рис.10 (слева снизу). Мембранная локализация антигена CD117 (стрелки) на поверхности дегранулирующих тучных клеток. После иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и последующим введением инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1. Увеличение 1000×.

Рис.11 (справа снизу). Стадия полной дегрануляции тучных клеток. После вакцинации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и последующим введением инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1. Увеличение 1000×.

На рис. 8 приведены результаты идентификации ТК в перибронхиальной области легких мыши, проведенной с помощью моноклональных антител к антигену CD117, характерному для тучных клеток. Видно, что в легких мышей контрольной группы тучные клетки имеют слабую степень дегрануляции, либо не имеют ее вообще. Даже в перибронхиальной области тучные клетки располагаются периваскулярно. После вакцинации экспериментальных животных штаммом А/Вьетнам/Н5N1 с последующим введением инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1 через 8 дней после инфицирования наблюдалось усиление дегрануляции ТК и увеличение их численности в легких (рис.9). При этом локализация ТК сохранялась, они обнаруживались преимущественно перибронхиально и периваскулярно (рис. 9). Существенно, что антиген CD117 локализован почти исключительно на плазмалемме тучных клеток (рис. 10). Нередко наблюдали полную дегрануляцию ТК в ответ на введение инфекционного штамма (рис. 11). Одним из морфологических результатов дегрануляции ТК в ответ на введение инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1 было усиление миграции лимфоидных клеток в перибронхиальную область и увеличение плотности клеток в этом инфильтрате.

Патоморфологическое исследование легких при гриппозной инфекции.

Гистологическая картина нормальных легких мышей контрольной группы (вне иммунизации и инфицирования) представлена на рис. 12. В стенках дыхательных путей выявлена бронхоассоциированная лимфоидная ткань. На рис. 13 представлены результаты гистологического исследования ткани легких мышей, не получивших вакцинного штамма А/Нью Йорк/Н1N1pdm09, введение которого было заменено на введение физиологического раствора (контроль), но инфицированных штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09. Результатом введения штамма А/Южная Африка/Н1N1pdm09 в этом случае по данным гистологического исследования становится развитие бронхопневмонии. В просвете бронхов появляется патологический секрет, который является продуктом разрушения и десквамации бронхиального эпителия. Одновременно появляются разрывы в эпителиальном монослое. Процесс воспаления распространяется на альвеолы, что приводит к нарушению их структуры (рис. 13) и утолщению межальвеолярных перегородок.

После инфицирования вирусом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 животных, предиммунизированных А/Нью Йорк/Н1N1pdm09, мононуклеарная инфильтрация отмечается в стенках бронхов и вокруг сосудов (рис. 14, 2). Выявлены дистрофические изменения эпителия и его десквамация, а также умеренные изменения структуры альвеол (рис. 14, 1) и интерстициальная инфильтрация в межальвеолярные перегородки и эмфизема (рис. 14, 3). Существенно, что в ответ на введение вируса как без предварительной иммунизации (рис. 13), так и после иммунизации штаммом

А/Нью Йорк/Н1N1 pdm09 (рис. 14,15) в поле зрения препарата не выявляются заполненные гранулами тучные клетки.

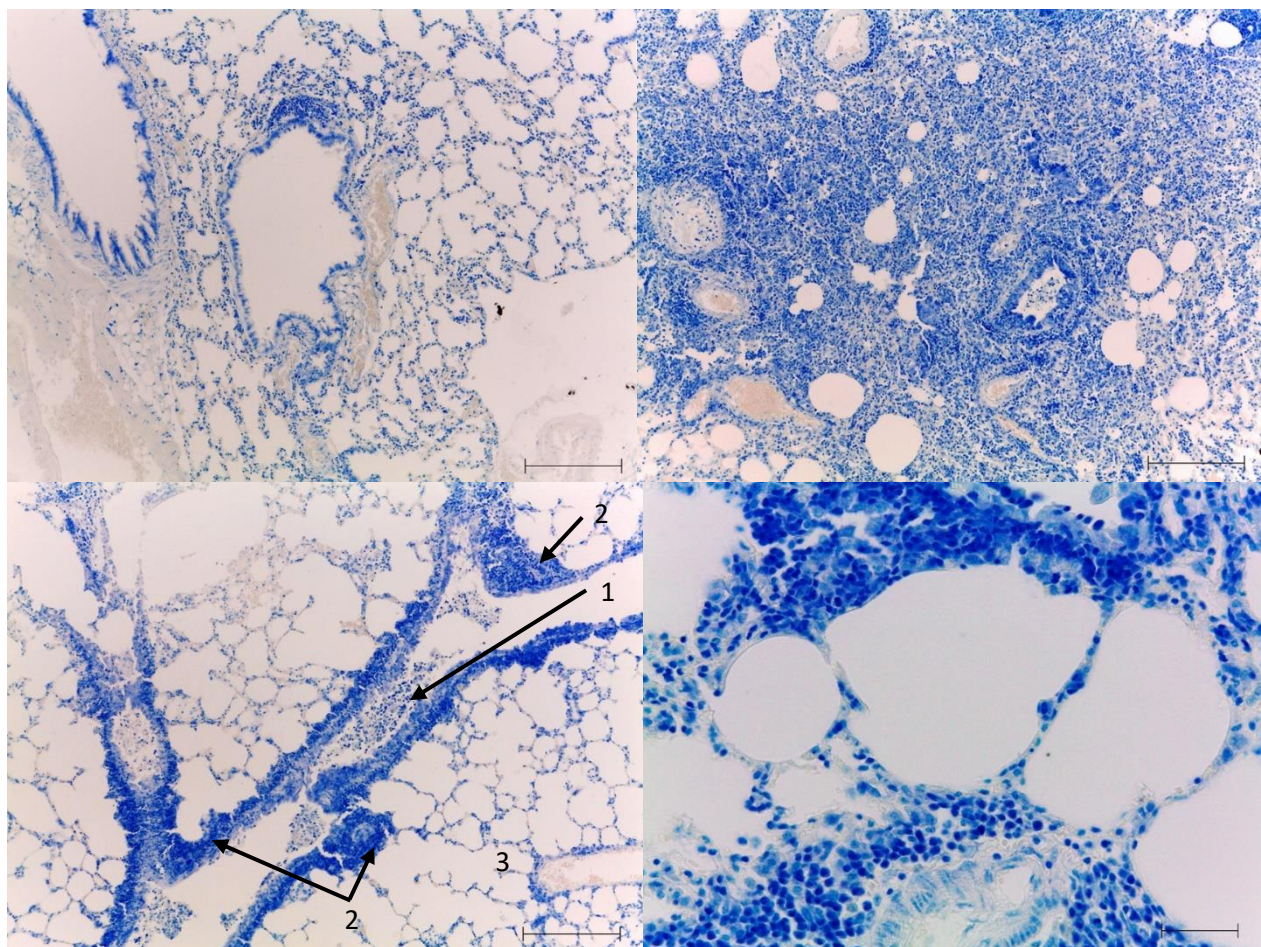


Рис. 12 (слева сверху). Гистологическая картина легких контрольных (неиммунизированных) мышей. Объектив 10×. Масштаб 200 мкм.

Рис.13 (справа сверху). Детальная гистологическая картина легких мышей, не иммунизированных штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 и инфицированных штаммом А/Южная Африка/Н1N1 pdm09, на 8 день после инфицирования. Объектив 40×, масштаб 50 мкм.

Рис. 14 (слева снизу). Обзорная гистологическая картина легких мышей, иммунизированных штаммом А/Нью Йорк/Н1N1 pdm09 и инфицированных штаммом А/Южная Африка/Н1N1 pdm09, на 8 день после инфицирования. Объектив 10×, масштаб 200 мкм. 1 – секрет в просвете бронха, 2 – инфильтраты мононуклеарных клеток, 3 – деструктивные изменения альвеол.

Рис. 15 (справа снизу). Мононуклеарная инфильтрация в межальвеолярном пространстве легких мышей после вакцинирования штаммом А/Нью Йорк/Н1N1 pdm09 и инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1 pdm09, на 8 день после инфицирования. Объектив 40×. Масштаб 50 мкм. На всех Рис.12-15 окраска толуидиновым синим - эозином.

Влияние блокаторов гистаминовых рецепторов на течение гриппозной инфекции. На рис. 16 приведены результаты оценки влияния антигистаминных препаратов на уровень гистамина у мышей через 14 дней после вакцинации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и на 8-й день после инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1.

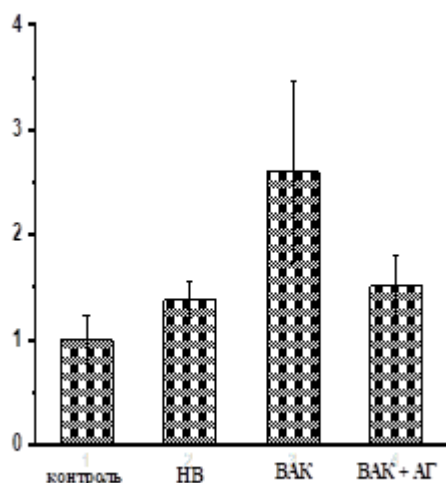


Рис. 16. Уровень гистамина в сыворотке крови мышей разных групп на 8-й день после инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1 после введения комбинации антигистаминных препаратов.

По оси абсцисс: группы, Контроль (интактные животные); НВ – неиммунизированные животные (ЗФР); ВАК – мыши, иммунизированные штаммом А/Вьетнам/Н5N1 за 14 дней до инфицирования; ВАК + АГ – мыши, иммунизированные штаммом А/Вьетнам/Н5N1 за 14 дней до инфицирования и получившие комбинацию

антигистаминных препаратов. По оси ординат: концентрация гистамина в сыворотке крови по результатам ИФА, нг/мл. $M \pm m$, $n \geq 4$.

Приведенные на рис.16 результаты показывают, что введение комбинации блокаторов Н1 и Н2-рецепторов приводило к снижению уровня гистамина в сыворотке крови инфицированных мышей, хотя все изменения носили характер тенденции и не были статистически достоверными относительно всех приведенных контролей (интактные животные, животные, получившие физраствор и животные, вакцинированные штаммом А/Вьетнам/Н5N1. При этом введение этих препаратов не оказывало достоверного влияния на титр вирусов гриппа штаммов А/Н5N1, высеваемых из легких, но достоверно понижало титр вирусов штамма А/Н1N1pdm09, высеваемых из легких по ходу гриппозной инфекции (рис. 17 и 18). При попарном сравнении результатов оценки уровней репродукции вируса гриппа штамма А/Н5N1 в легких мышей без предварительной иммунизации (рис. 17, 1 и 2) и после предиммунизации (рис. 17, 3 и 4) видно, что введение комбинации блокаторов гистаминных рецепторов реально не оказывает влияния на содержание вируса в ткани легких при гриппозной инфекции. Напротив, для вирусов гриппа штамма А/Н1N1pdm09 выявлено достоверное снижение уровня репродукции вируса из ткани легких (рис.18). При этом это снижение связано не столько с введением антигистаминных препаратов, сколько с предварительной иммунизацией животных штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09. Это следует из анализа попарных различий между иммунизированными и неиммунизированными животными, у иммунизированных

животных уровень репродукции вируса инфекционного штамма А/Южная Африка/Н1N1pdm09 из легких ниже на 41% без введения комбинации антигистаминных препаратов (рис. 18, 1 и 3, $p < 0,05$) и на 54% после введения блокаторов гистаминных рецепторов (рис. 18, 2 и 4, $p < 0,05$). При этом антигистаминные препараты сами по себе не обеспечивали снижения уровня репродукции штамма вируса А/Н1N1pdm09, точно также, как выше это было показано для штамма А/Н5N1 (рис. 17).

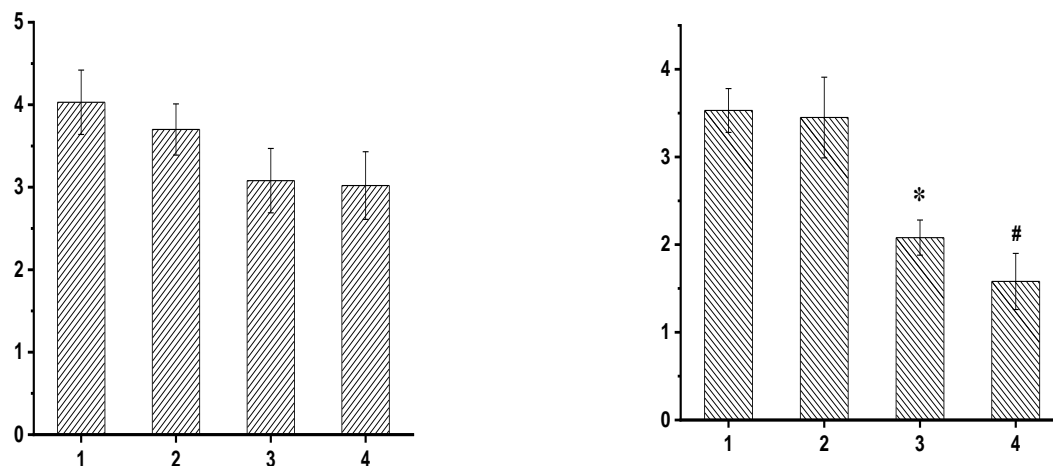


Рис. 17 (слева). Содержание вирусов инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1 после иммунизации вакцинными штаммами вируса гриппа на фоне введения блокаторов антигистаминных рецепторов.

Рис. 18 (справа). Содержание вирусов инфекционного штамма А/Южная Африка/Н1N1pdm09 после иммунизации вакцинными штаммами вируса гриппа на фоне введения блокаторов антигистаминных рецепторов.

По оси абсцисс: 1 – контроль, введение ЗФР; 2 – введение ЗФР и блокаторов антигистаминных рецепторов; 3 - предиммунизация штаммом А/Вьетнам/Н5N1; 4 – предиммунизация штаммом А/Вьетнам/Н5N1 (для рис.17) А/Нью Йорк/Н1N1 (для рис.18) на фоне введения блокаторов антигистаминных рецепторов. По оси ординат: число вирусных частиц инфекционного штамма в ткани, $-\lg_{10}$ ЭИД₅₀/мл, $n=5$ по каждой точке. * - различия достоверны с контролем (1) при $p < 0,05$; # - различия достоверны с контролем (2) при $p < 0,05$.

При анализе морфологических последствий применения блокаторов Н1- и Н2-рецепторов между штаммами вируса гриппа Н1N5 и Н1N1 установлены выраженные различия (рис. 19–22). На рис. 19 представлен вид тотально дегранулирующих тучных клеток мышей после вакцинации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1 на фоне введения антигистаминных препаратов. Видно, что, как и на рис. 18–20, в ответ на инфицирование вирусом птичьего гриппа на фоне введения хлоропирамина и фамотидина, происходит тотальная дегрануляция тучных клеток с выбросом всех цитоплазматических гранул. Эта картина существенно

отличается от результата, представленного на рис. 20 на котором приведены аналогичные результаты для штамма вируса гриппа А/Н1N1pdm09, в случае которого тучные клетки не имеют признаков дегрануляции, и их цитоплазма полностью заполнена гранулами.

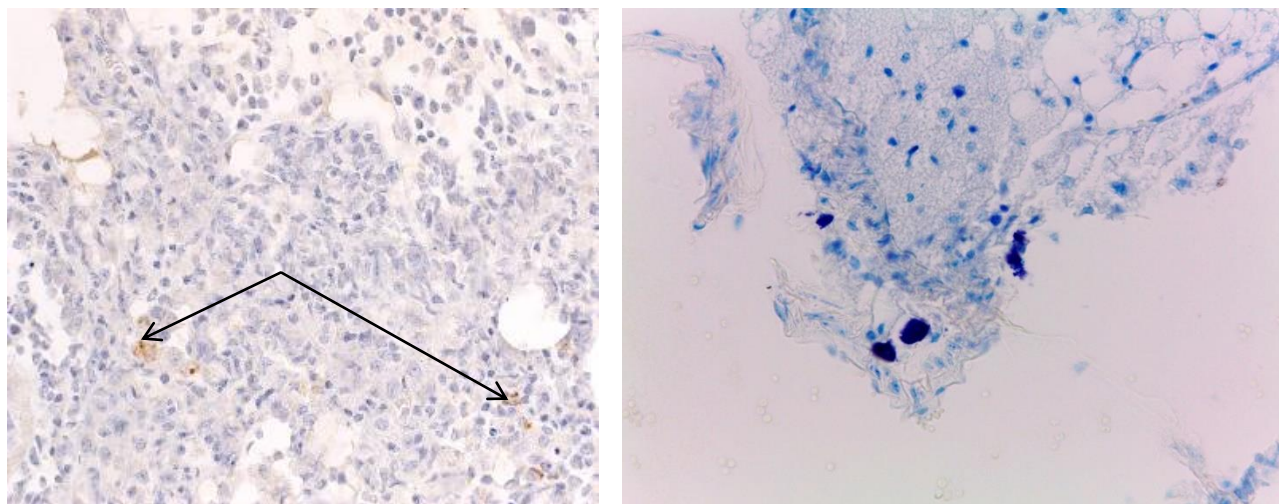


Рис. 19 (слева). Иммуногистохимическое окрашивание дегранулирующих тучных клеток мышей после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1 на фоне введения антигистаминных препаратов. Окраска антителами к антигену CD117, докрасивание гематоксилин-эозином. Увеличение 400×. Стрелки - частично дегранулированные тучные клетки.

Рис. 20 (справа). Тучные клетки без признаков дегрануляции в легких мышей после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09, инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 на фоне введения антигистаминных препаратов. Окрашивание толуидиновым синим. Увеличение 400×.

В случае штамма вируса гриппа птичьего происхождения А/Н5N1 введение антигистаминных препаратов не сказывается ни на размерах, ни на клеточности перибронхиальной лимфоидной ткани, когда вся область вокруг бронха была заполнена мононуклеарными клетками. В случае гораздо более распространенного в популяции штамма А/Н1N1pdm09 введение хлоропирамина и фамотидина заметно снижает уровень миграции мононуклеарных клеток в перибронхиальную область и уменьшает плотность клеток в сформированных ранее участках бронх-ассоциированной лимфоидной ткани. В результате введение антигистаминных препаратов при инфицировании вирусами А/Н5N1 или А/Н1N1pdm09 по-разному сказывалось на инфильтрации межальвеолярного пространства мононуклеарными клетками, что отражалось на его ширине и, по-видимому, уровне газообмена в легких. При поствакцинальном введении вируса штамма А/Н5N1 структура альвеол была существенно изменена, отмечался выраженный отек, массивная инфильтрация

мононуклеарами и другие признаки развития пневмонии (рис. 21). Напротив, инъекция блокаторов гистаминовых рецепторов в случае поствакцинального инфицирования штаммом А/Н1N1pdm09 обеспечивало формирование принципиально иной картины (рис. 22): хотя определенная инфильтрация межальвеолярного пространства все равно отмечалась, но его ширина была умеренной, а признаки отека не были выраженными.

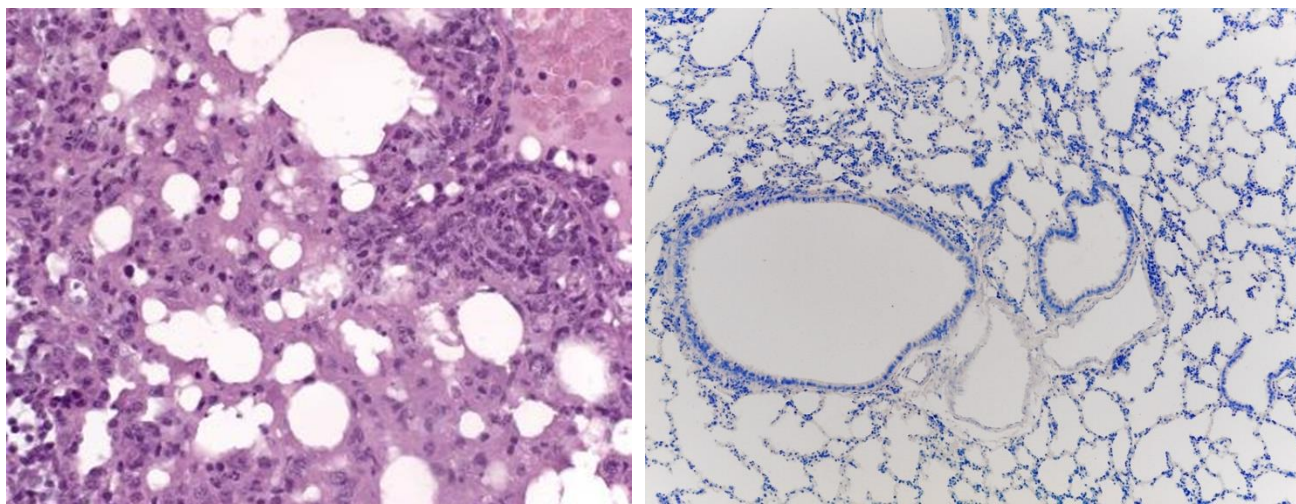


Рис. 21. Измененная структура легочной ткани мышей после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1 на фоне введения антигистаминных препаратов. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 400×.

Рис. 22. Минимальные изменения в легочной ткани мышей после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09, инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 на фоне введения антигистаминных препаратов. Окрашивание толуидиновым синим. Увеличение 200×.

Масса тела является важным интегративным показателем, который может быть востребован для прогноза продолжительности жизни при старении и инфекционном заболевании. Эта связь основана на роли одного из важнейших показателей остроты воспалительного процесса – сывороточного уровня TNF α – в снижении массы тела. Результаты оценки выживаемости в целом полностью совпадают с результатами изменения массы тела мышей: вирус А/Н5N1 оказывал выраженное действие на выживаемость и вызывал гибель 60% животных, то пандемический вирус А/Н1N1pdm09 оказывал небольшое влияние на этот показатель и вызывал гибель лишь небольшой доли иммунизированных животных (Рис. 23 и 24).

Из графика Каплана-Майера на рис. 23 видно, что вирус А/Н5N1 вызывал основную гибель животных на 6-е сутки после инфицирования во всех группах вне зависимости от предшествующей иммунизации и введения антигистаминных препаратов. По итогам 12-суточного наблюдения наибольшая летальность (свыше 60%) отмечена в группе 2, которую составили неиммунизированные мыши,

получившие блокаторы антигистаминных рецепторов. Однако именно предварительная иммунизация штаммом А/Вьетнам/Н5N1 обеспечивала достоверно более высокую выживаемость животных в ответ на антигенно отличающийся штамм А/Индонезия/Н5N1: если без введения антигистаминных препаратов она составила 70% (группа 3), то при введении блокаторов антигистаминных рецепторов она возросла до 83% (рис. 23, группа 4). Этот результат указывает как на высокий протективный эффект иммунизации, так и на существенную роль массивной дегрануляции тучных клеток, вызванной штаммом вируса гриппа А/Н5N1 в патогенезе заболевания и осложнении его течения.

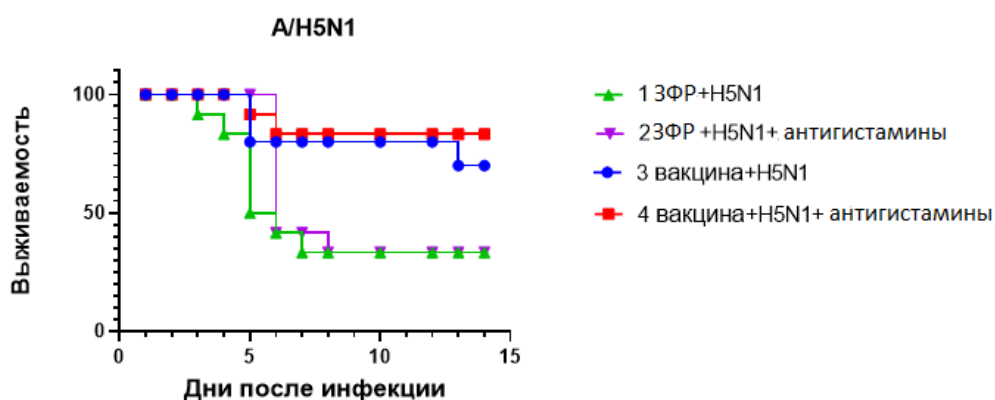


Рис. 23. Кривые Каплана-Майера выживаемости животных разных экспериментальных групп после инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1. Номера групп и обозначения приведены в поле рисунка.

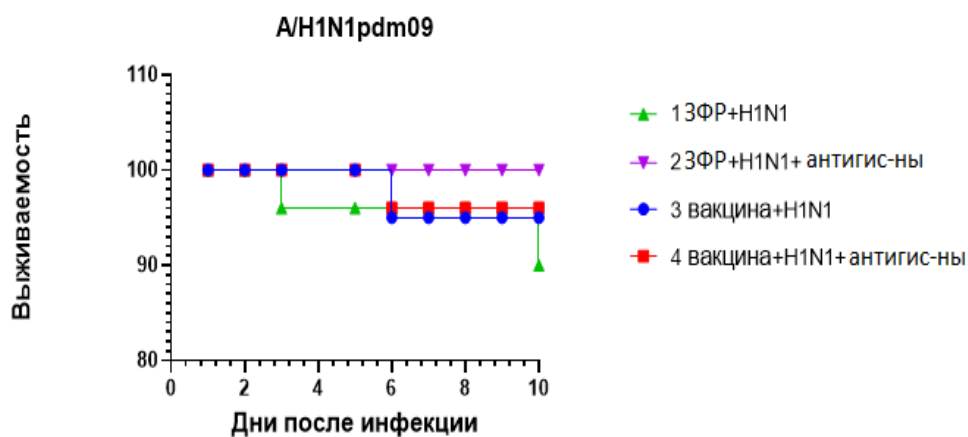


Рис. 24. Кривые Каплана-Майера выживаемости животных разных экспериментальных групп после инфицирования пандемическим штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09. Номера групп и обозначения приведены в поле рисунка.

В случае заражающего вируса А/Южная Африка/Н1N1pdm09 наибольшая смертность (10%) была отмечена в группе неиммунизированных животных, не

получивших комбинацию антигистаминных препаратов (группа 1). При добавлении антигистаминных препаратов (группа 2) выживаемость животных в ответ на инфицирование штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 была 100%-ной (рис. 24, группа 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты подтверждают гипотезу о важной роли связывания IgG-содержащих иммунных комплексов с тучными клетками для активации тучных клеток и запуска секреторной дегрануляции. Значимость этих процессов особенно возрастает в случае гриппозной инфекции, когда антигеном в составе циркулирующего иммунного комплекса является вирус гриппа. Доказано, что циркулирующие иммунные комплексы, состоящие из термоагрегированного IgG, либо включающие в свой состав вирусы гриппа штаммов А/Индонезия/Н5N1 или А/Южная Африка/Н1N1pdm09, усиливают секрецию гистамина тучными клетками до 2-х раз относительно контроля.

Связывание вируса гриппа с тучными клетками является результатом применения схемы предшествующей иммунизации, согласно которой иммунизация за 14 суток до инфицирования дрейфовым вирусом того же подтипа, при этом динамику продукции антител наблюдали на протяжении следующих 8-14 суток. При этом общий срок гуморального иммунного ответа составил до 28 суток, что приводит к преимущественной продукции антител класса IgG. Результаты работы подтверждают, что использование такой модели гриппозной инфекции сопровождается преимущественной продукцией антител подклассов IgG1 и IgG2a, которые обладают способностью к связыванию с Fc γ -рецепторами на поверхности тучных клеток. Предполагается, что на избранных сроках наблюдения также происходит переключение на синтез IgE-антител, что также подтверждается экспериментальными данными, согласно которым возможен запуск дегрануляции тучных клеток как в ответ на циркулирующие иммунные комплексы, содержащие вирус гриппа и иммуноглобулины класса IgG, так и при прямом контакте вируса с тучной клеткой через связанные с ее мембранными Fc ϵ -рецепторами антитела класса IgE.

Уровень секреции гистамина тучными клетками зависит от штамма вируса гриппа: в случае нового для популяции высокопатогенного штамма А/Н5N1 наблюдается повышение секреции гистамина в 2-8 раз относительно длительно циркулирующего в популяции штамма А/Н1N1. Принципиально новый результат связан с сопоставлением уровней секреции гистамина и триптазы тучными клетками при экспериментальной гриппозной инфекции, которые находятся в реципрокных взаимоотношениях. Объяснением этого феномена, а также разных уровней секреции гистамина в ответ на штаммы А/Н5N1 и А/Н1N1pdm09 могут быть различные сигнальные пути, обеспечивающие секрецию гистамина и триптазы в тучных клетках,

а также различия в характере связывания компонентов разных штаммов с внутриклеточными рецепторами врожденного иммунитета (TLR-3, TLR-7-9, NOD, RIG).

Секреция гистамина, одного из важнейших медиаторов воспаления и хемоттактантов, приводит к миграции лейкоцитов крови в очаг поражения. Это подтверждается результатами морфологического исследования, согласно которым степень выраженности признаков воспаления в легких (отек, инфильтрация межальвеолярного пространства мононуклеарами, наличие секрета в просвете бронхов, объем перибронхиальной лимфоидной ткани и др.) полностью совпадает со степенью активации тучных клеток и уровнем секреции гистамина в ответ на инфицирование различными штаммами вируса гриппа. В ответ на инфицирование штаммом А/Н5N1 все указанные изменения носят более выраженный характер по сравнению с ответом на штамм А/Н1N1pdm09.

Значимая роль секреции гистамина в патогенезе гриппозной инфекции подтверждается результатами оценки влияния блокаторов H1- (хлоропирамин) и H2-рецепторов (фамотидин). Их введение экспериментальным животным приводило к снижению уровня гистамина в циркуляции, выраженному изменению патоморфологической картины процесса (уменьшение дегрануляции тучных клеток и отека легочной ткани, мононуклеарной инфильтрации, секреции, уровень тканевого содержания вируса) и как результат к снижению летальности. Если иммунизация является оптимальным способом снижения летальности и даже в случае высокопатогенного для мышей штамма А/Н5N1 уменьшает ее на 70%, то добавление комбинации хлоропирамина и фамотицина доводит этот показатель до 82%.

Таким образом, дегрануляция тучных клеток под действием IgG-содержащих иммунных комплексов может быть важным элементом патогенеза гриппозной инфекции и лежать в основе волнообразного течения патологического процесса даже на поздних сроках (более 10 суток) после инфицирования, что основывается на переключении классов синтезируемых противовирусных антител и повторной стимуляции формирующимися комплексами тучных клеток. Этот феномен также может лежать в основе неэффективности и потенциальной опасности вакцинации после перенесенной гриппозной инфекции в силу развития феномена антитело-зависимого усиления (ADE-синдром).

ВЫВОДЫ

1. Связывание иммунных комплексов, содержащих агрегированные иммуноглобулины класса IgG, с тучными клетками перитонеального экссудата приводит к их активации и дегрануляции, которая сопровождается дозозависимым усилением секреции гистамина.
2. При экспериментальной гриппозной инфекции IgG-содержащие иммунные комплексы вызывают дегрануляцию тучных клеток и секрецию гистамина, что приводит к индукции патофизиологических изменений тканей легких и бронхов и осложнению течения патологического процесса.
3. Уровень секреции гистамина, индуцированного иммунными комплексами, содержащими вирус гриппа и IgG, носит штаммоспецифичный характер: в случае заражения штаммом A/H5N1 наблюдается более выраженная дегрануляция тучных клеток, чем в случае штамма A/H1N1pdm09.
4. Продукция триптазы под влиянием противовирусных IgG-содержащих иммунных комплексов находится в реципрокной зависимости от продукции гистамина.
5. Введение блокаторов гистаминных рецепторов хлоропирамина и фамотидина уменьшает последствия выброса гистамина при экспериментальной гриппозной инфекции приводя к минимизации альтерации тканей и снижению летальности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и изданиях, входящих в зарубежные базы данных:

1. **Мамонтов, А.С.** Антигенспецифические реакции тучных клеток / А.С. Мамонтов, П.Г. Назаров, Ю.А. Дешева, Л.Г. Руденко // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, №. 4. – С. 160-161.
2. **Мамонтов, А.С.** Возможная роль тучных клеток в патогенезе тяжелого течения экспериментальной инфекции у мышей, сенсibilизированных к гриппу / А.С. Мамонтов, Ю.А. Дешева, П.Г. Назаров, Л.Г. Руденко // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 11, №. 3. – С. 422-424.
3. **Мамонтов, А.С.** Экспериментальное изучение антителозависимых реакций тучных клеток на моделях гриппозной инфекции / А.С. Мамонтов, Д.В. Исаков, П.Г. Назаров, Ю.А. Дешева // Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 10, №. 2S1. – С. 75-76.
4. Desheva, Y. Mucosal vaccine based on attenuated influenza virus and the group B. Streptococcus recombinant peptides protected mice from influenza and S. pneumoniae infections / Y. Desheva, G. Leontieva, T. Kramskaya, K. B. Grabovskaya, **A. Mamontov**, P. Nazarov, A. Suvorov, V. Karev // PLoS ONE. – 2019. – V. 14, №. 6. – P. e0218544.

5. Desheva, Y. Mast Cell Degranulation And Histamine Release During A/H5N1 influenza infection in influenza-sensitized mice / Y. Desheva, **A. Mamontov**, N. Petkova, P. Nazarov, V. Karev // *Life Sciences*. – 2020. – V. 258. – P. 118230.
6. Desheva, Yu. A. Contribution of antibody-dependent enhancement to the pathogenesis of coronavirus infections / Yu. A. Desheva, **A. Mamontov**, P.G. Nazarov // *AIMS Allergy and Immunology*. – 2020. – V. 15. – P. 16.
7. **Mamontov, A.** Study of antibody-dependent reactions of mast cells in vitro and in a model of severe influenza infection in mice / A. Mamontov, A. Polevshchikov, I. Losev, Y. Desheva, D. Korzhevskii, V. Guselnikova // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – V. 12. – P. 689436
8. Desheva, Y. Antigenic Characterization Of Neuraminidase Of Influenza A/H7N9 viruses isolated in different years / Y. Desheva, I. Losev, N. Petkova, P. Kudar, S. Donina, **A. Mamontov**, Ch. H. Tsai, Yu. Ch. Chao // *Pharmaceuticals*. – 2022. – V. 15, №. 9. – P. 1127.
9. **Mamontov, A.** Mast cells in severe respiratory virus infections: insights for treatment and vaccine administration / A. Mamontov, A. Polevshchikov, Y. Desheva // *AIMS Allergy and Immunology*. – 2023. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-23.

Тезисы докладов основные:

1. **Mamontov, A.S.** Mast cells degranulation and histamine release during influenza A/H5N1 infection in mice / A.S. Mamontov, Y.A. Desheva, P.G. Nazarov // В книге: Дни вирусологии - 2020. Материалы Международного форума. – Санкт-Петербург, 2020. – С. 15.
2. **Мамонтов, А.С.** Изучение способности IgG-содержащих иммунных комплексов активировать тучные клетки и вызывать выброс гистамина в системе in vitro / А.С. Мамонтов, Ю.А. Дешева // В книге: Вирусные инфекции - от диагностики к клинике. сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 120-летию со дня рождения академика А. А. Смородинцева. – Санкт-Петербург, 2021. – С. 29.

Список сокращений

АГ - антигистаминные препараты; **в/м** – внутримышечно; **ГАЕ** – гемагглютинирующая единица; **и/н** – интраназально; **ЗФР** - забуференный фосфатами физиологический раствор, рН7,4; **ИФА** - иммуноферментный анализ; **ОФА** - ортофталевый альдегид; **РГА** - реакция гемагглютинации; **РТГА** - реакция торможения гемагглютинации; **ТК** - тучная клетка; **АДЕ** – антитело-зависимое усиление; **НА** - гемагглютинин; **НА** - нейраминидаза; **ОД** – оптическая плотность.