

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

МАМОНТОВ
Андрей Сергеевич

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

3.3.3. Патологическая физиология
3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук, профессор
Полевщиков Александр Витальевич,
доктор медицинских наук, доцент
Дешева Юлия Андреевна

Санкт-Петербург
2024 г.

Оглавление

	Стр.
Оглавление	2
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Тучные клетки: общий анализ	15
1.2. Анализ некоторых рецепторов тучных клеток	18
1.3. Участие тучных клеток в патогенезе гриппа и острых респираторных инфекций (ОРВИ)	21
1.4. Феномен ADE	26
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1. Экспериментальные животные	31
2.2. Вирусы гриппа	31
2.2.1. Получение инактивированного вирусного материала	32
2.3. Получение и оценка активности тучных клеток перитонеального экссудата	32
2.4. Иммунизация мышей вирусом гриппа	33
2.5. Серологические методы	33
2.5.1. Реакция гемагглютинации (РГА)	33
2.5.2. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)	34
2.6. Метод оценки дегрануляции ТК	34
2.7. Метод оценки концентрации гистамина в супернатанте	36
2.8. Метод оценки концентрации гистамина в тканевых образцах	37
2.9. Оценка роли тучных клеток при гриппозной инфекции	37
2.10. Иммуноферментный анализ	39
2.11. Методы гистологического исследования	40
2.12. Оценка влияния антигистаминных препаратов	40
2.13. Статистические методы	41
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
3.1. Получение противогриппозных антител	42

3.1.1. Иммунизация и ее результаты	42
3.1.2. Определение содержания инфекционного вируса в легких после экспериментальной инфекции заражающими вирусами, на 14 день после иммунизации	47
3.2. Оценка дегрануляции ТК, опосредованной антителами класса IgG, <i>in vitro</i>	48
3.2.1. Результаты морфологического исследования	48
3.2.2. Доказательства возможности дегрануляции ТК под действием содержащих IgG иммунных комплексов	49
3.2.3. Оценка уровня дегрануляции ТК перитонеального экссудата под влиянием свободных и комплексированных с IgG вирусов гриппа <i>in vitro</i>	52
3.3. Оценка уровня дегрануляции ТК в легких в ответ на заражение животных вирусом гриппа	54
3.3.1. Сывороточные уровни гистамина и триптазы в ответ на гриппозную инфекцию	54
3.3.2. Морфологическая оценка уровня дегрануляции ТК в легких в ответ на заражение животных вирусом гриппа	57
3.4. Патоморфологическое исследование легких при гриппозной инфекции	63
3.5. Влияние блокаторов гистаминовых рецепторов на течение гриппозной инфекции	70
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	85
4.1. Дегрануляция тучных клеток при связывании Fc γ -рецепторов	85
4.2. Дегрануляция тучных клеток в присутствии различных штаммов вируса гриппа	88
4.3. Сопоставление патофизиологических последствий дегрануляции тучных клеток в тканях при инфицировании различными штаммами вируса гриппа	93

4.4. Влияние блокаторов гистаминных рецепторов на течение экспериментальной гриппозной инфекции	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ВЫВОДЫ	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	109
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Роль тучных клеток (ТК) 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 [2]. 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 [120]. 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 [82, 97, 102]. В определенных ситуациях антитела к вирусам могут усиливать вирусные инфекции. Об этом явлении, которое теперь называют антителозависимым усилением вирусных инфекций (англ.: antibody-dependent enhancement, ADE), впервые сообщил R.Hawkes в 1964 году [60, 93]. 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 [22]. Развитие ADE было отмечено и при коронавирусной инфекции 2019 г. (англ.: coronavirus disease 2019, COVID-19) [126].

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 гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA), 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) [9]. Компоненты гранул ТК классифицируются по функциональным характеристикам [48], 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 [43]. 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 [68]. 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

матриксного белка и компонентов гранул [37]. 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 [66, 85, 168, 174]. Установлено, что ТК могут способствовать патологическим изменениям при инфекциях, вызванных высокопатогенными вирусами гриппа [66]. ТК инфицируются вирусами гриппа *in vitro*, и сигнальные пути могут различаться в зависимости от подтипа вируса [69, 168]. Стимуляция ТК *in vitro* вирусами гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2 приводила к различным профилям экспрессии цитокинов, хемокинов и противовирусных генов [112]. 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) [81] и 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 иммунизации. 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 [167].

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:

1. оценить на тучных клетках мышей возможность активации и дегрануляции тучных клеток при связывании Fc γ -рецепторов;
2. изучить на тучных клетках мышей 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 у мышей линии СВА;
4. оценить последствия введения блокаторов гистаминовых рецепторов в патогенезе экспериментальной гриппозной инфекции у мышей линии СВА.

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, участие тучных клеток в патогенезе экспериментальной вирусной инфекции выражено сильнее, чем в случае штамма A/H1N1pdm09. Впервые доказано, что механизм запуска дегрануляции тучных клеток различается между их мембранными рецепторами Fc γ и Fc ϵ , а 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 потенциально пандемический штамм A/H5N1 уровень секреции гистамина дозозависимо нарастает, а триптазы снижается. Также показано, что в случае этого штамма

провоспалительные эффекты гистамина *in vivo* слабее купируются блокаторами гистаминовых H1- (хлоропирамин) и H2 (фамотидин) - рецепторов, чем в случае пандемического штамма A/H1N1pdm09. Впервые проведен патоморфологический анализ экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной потенциально пандемическим штаммом A/H5N1 в сравнении с циркулирующим в популяции пандемическим штаммом A/H1N1pdm09. Доказано, что дегрануляция тучных клеток, индуцированная вирусом штамма A/H5N1 и/или его комплексами с IgG, приводит к слабо купируемой антигистаминными препаратами сливной дегрануляции тучных клеток, 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

Теоретическое значение работы 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 иммунизации 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. Также на разработанной модели исследован вопрос о значении интервала между иммунизацией и заражением. Большая часть полученных результатов может быть востребована 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 соответствие 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 Fcε-, так и Fcγ-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 A/H5N1 продукция гистамина тучными клетками выше, чем в случае пандемического штамма A/H1N1pdm09.

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 A/H1N1pdm09 и менее эффективно в случае штамма A/H5N1.

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.).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Тучные клетки: общий анализ

Локализация. Тучные клетки (ТК) и базофилы, согласно современным представлениям, происходят из общего прогенитора, относящегося к миелоидному ростку, который в свою очередь является производным гемопоэтической стволовой клетки (CD34+). При этом, если костномозговое происхождение базофилов считается доказанным фактом, то многие аспекты гистогенеза тучных клеток остаются неясными [2]. Дозревание и дифференцировка ТК происходят уже непосредственно в тканях, при этом свойства ТК зависят от их локализации, и ТК обнаружены во всех тканях и структурах, включая мозговые оболочки и ЦНС [1]. Одним из немногочисленных исключений из этого правила является сетчатка, в которой до настоящего времени достоверно не показано наличие ТК. Тучные клетки располагаются вблизи кожи и слизистых оболочек, куда чаще всего попадают инфекционные патогены или чужеродные антигены [32]. Тучные клетки синтезируют и накапливают в цитоплазматических гранулах биологически активные вещества (гистамин, простагландин, лейкотриены) и факторы хронического воспаления (цитокины, хемокины), а также факторы ремоделирования тканей (протеазы, факторы роста) [34]. В рамках воспаления и других физиологических реакций ТК являются одновременно афферентами и эфферентами, вовлеченными в иммунные и неиммунные взаимодействия, и оказывают плеiotропные эффекты в отношении различных клеток в тканях в норме, по ходу воспаления и репаративных процессов [52]. Участие ТК в процессах физиологической регуляции в норме, при воспалении и репарации подтверждается данными эволюционной гистологии и физиологии, согласно которым у позвоночных животных тучные клетки (а также циркулирующие базофилы крови) появляются уже у первых позвоночных (миног и миксин), а

их возникновение, по-видимому, связано с углублением тканевой дифференцировки и усложнением форм нейрональной и гуморальной регуляции [18]. У млекопитающих этот тип клеток вовлечен в различные регуляторные процессы, такие как иммуномодулирующее действие, восстановление ткани и регенерация после травмы, ангиогенез и, возможно, другие биологические функции [125]. При этом наиболее изученной и демонстративной является роль тучных клеток в запуске воспаления и противоинфекционной защите [46].

Состав гранул. Тучные клетки синтезируют и накапливают в гранулах множество биологически активных веществ и медиаторы хронического воспаления (цитокины, хемокины), а также факторы ремоделирования тканей (протеазы, факторы роста) [34]. Компоненты гранул ТК классифицируются по функциональным характеристикам: на предварительно сформированные компоненты, обеспечивающие немедленные реакции ТК, и компоненты, синтезированные в ответ на сигналы активации, которые связаны с длительными формами их ответных реакций [48]. ТК человека обычно классифицируются в зависимости от содержания нейтральных протеаз - триптаз и химаз - в их гранулах. Эта классификация включает три типа тучных клеток: содержащие только триптазу; ТКТ, содержащие триптазу и химазу; ТКх содержащие только химазу в составе гранул [43]. 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 [43]. Основываясь на индуцированной способности ТК синтезировать как провоспалительные цитокины, так и различные факторы роста, существуют предложения разделить ТК на провоспалительные ТК1 и противовоспалительные ТК2 по аналогии с популяциями макрофагов [68].

Тучные клетки, важнейшие эффекторные клетки при аллергических реакциях первого типа и запуске любого воспаления, высвобождают различные вазоактивные вещества, в том числе гистамин, SRSA (медленно реагирующий фактор анафилаксии) и серотонин. К числу медиаторов воспаления, существенно влияющих на его амплитуду, относятся лейкотриены, простагландины и PAF (тромбоцит активирующий фактор), которые синтезируются активированными тучными клетками из арахидоновой кислоты. Цитокины (IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17, TNF α и TGF- β 1), хемокины (CCL1, CCL2, CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CXCL2) и факторы роста (VEGF, PDGF, bFGF, EGF, IGF-1 и NGF) синтезируются *de novo* и также высвобождаются вскоре после активации [34].

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 матриксного белка и компонентов гранул [37].

Наиболее изученным и часто упоминаемым медиатором в фазе быстрой дегрануляции 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. В норме гистамин является неотъемлемым компонентом почти всех органов, тканей, полостных жидкостей, выделений, крови; его наибольшее содержание отмечается в коже (особенно веках, голове, шее) и в легких. Содержание ионов кальция в клетках, продуцирующих гистамин, а также проницаемость клеточных мембран для этих ионов имеет большое значение в механизме синтеза и секреции гистамина [65]. Последствия повышенного высвобождения гистамина зависят от его

связывания с определенным типом гистаминовых рецепторов. H1-рецептор управляет миграцией клеток, активностью афферентных нервных волокон, расширением сосудов и бронхоконстрикцией, в то время как H2-рецептор изменяет секрецию соляной кислоты желудочного сока, выработку слизи в дыхательных путях и проницаемость сосудов [145].

Нейро-мастоцитарные контакты. Пространственная колокализация ТК и нервных окончаний была показана для слизистых оболочек различных органов и тканей, включая дыхательные пути. Показано прямое мембранно-мембранное взаимодействие между ТК и нервными окончаниями [164]. Нейро-мастоцитарная сигнализация осуществляется в основном за счет секреции медиаторов; но также возможно перемещение всей гранулы в цитоплазму нейрона [166]. В ходе нейро-мастоцитарных взаимодействий ТК может выступать в роли как рецепторной, так и эффекторной клетки. Медиаторы, секретируемые ТК, способны влиять на активность нейронов, предоставляя ЦНС информацию о начале воспалительного процесса и его локализации [132]. В последние годы накапливаются свидетельства того, что существует еще один механизм взаимодействия ТК с другими клетками, связанный с формированием и секрецией экстраклеточных везикул (EV). Везикулярная сигнализация, по-видимому, характерна для многих типов клеток, вовлеченных в разные формы аллергических реакций, в том числе для ТК, дендритных клеток, Т-лимфоцитов и мерцательного эпителия воздухоносных путей. Например, EV, секретируемые тучными клетками, индуцируют созревание дендритных клеток [49]. Отмечена способность EV, полученных из линий тучных клеток человека и мыши, переносить РНК к другим ТК [152]. Эксперименты *in vitro* показали, что EV, полученные из ТК, могут индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход клеток линии A549 аденокарциномы легких человека [170].

1.2. Анализ некоторых рецепторов тучных клеток

ТК экспрессируют различные рецепторы для PAMP, такие как поверхностные рецепторы распознавания для ассоциированных с патогенами молекулярных паттернов, например, поверхностные и внутриклеточные Toll-подобные рецепторы (TLR 1-9), внутриклеточные (NOD)-подобные рецепторы (NLR) и рецепторы семейства RIG [98]. Также на поверхности ТК экспрессируются рецепторы для продуктов активации каскада комплемента C3a и C5a (CR3, CR5) и Fc-рецепторы для иммуноглобулинов E и G [41,43, 98]. Соответственно, активация ТК происходит при участии как факторов врожденного, так и адаптивного иммунитета.

ТК могут также выступать в роли непрофессиональных антиген презентующих клеток [88]. Под действием IFN- γ на поверхности ТК экспрессия MHC-II или костимуляционных семейства B7 (CD80 и особенно CD86) возрастает. Этот феномен наблюдался как *in vitro* [75,142], так и *in vivo*, при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы у человека [4]. В исследованиях на животных также показано, что ТК могут презентировать антигены различным субпопуляциям Т лимфоцитов, включая регуляторные Т-клетки (Treg) и CD8⁺ Т-лимфоциты [75,142].

Поверхностные рецепторы Fc-фрагментов имеют множество функций в иммунной системе, опосредуя такие разнообразные функции как фагоцитоз, дегрануляцию базофилов и тучных клеток, а также способствуя переключению классов иммуноглобулинов и предотвращая чрезмерную активацию. Роль ТК и их высокоаффинных рецепторов для IgE (Fc ϵ RI) в реакциях гиперчувствительности немедленного типа и иммунокомплексных реакциях (феномен Артюса и др.) хорошо известна [79, 80]. Комплексы IgE и его рецептора Fc ϵ R длительное время сохраняются на поверхности ТК, что и является главным механизмом сенсибилизации к аллергену. При повторном контакте аллерген обеспечивает перекрестную сшивку комплексированных с Fc ϵ RI молекул IgE, что приводит к дегрануляции ТК с высвобождением медиаторов [51]. Напротив, физиологическая роль Fc γ R на поверхности ТК

остаётся неясной [134]. Имеются немногочисленные свидетельства их участия в клиренсе очага воспаления от бактериальных и вирусных антигенов путем секреции EV, секреции антимикробных пептидов, рекрутирования нейтрофилов или секреции внеклеточных ДНКовых ловушек [46, 107]. Внеклеточные ловушки, первоначально идентифицированные для нейтрофилов (NETs) [31], способны предотвращать диссеминирование микроорганизмов, а также увеличивать интерстициальное содержание антимикробных веществ [26]. Всё это не отменяет установленной ранее защитной роли IgE при паразитарных инвазиях у человека, при которых уровни патоген-специфического IgE и резистентности к заражению положительно коррелируют [113].

Различные классы Fc γ R экспрессируются на многих эффекторных клетках иммунной системы и опосредуют различные клеточные ответы, такие как фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность и дегрануляцию. У мышей рецептор Fc γ RI способен с высокой аффинностью связывать только один подкласс IgG2a, тогда как низкоаффинный Fc γ RIII связывает полимерные формы трех различных подклассов IgG (IgG1, IgG2a и IgG2b), но не связывает IgG3. Не так давно у мышей обнаружен еще один активирующий рецептор Fc γ RIV, который с промежуточной аффинностью связывает иммунные комплексы, содержащие IgG2a и IgG2b [16].

При сопоставлении результатов, полученных для Fc γ -рецепторов человека и мыши необходимо учитывать существенные различия между паттернами экспрессии Fc γ R человека и их гомологами мыши: 1) Fc γ RI экспрессируется у мыши (но не у человека) моноцитами; 2) Fc γ RIIB экспрессируется у человека, но не у мыши, в основном В-клетками и базофилами; 3) экспрессия человеческого Fc γ RIIA, но не мышиного Fc γ RIII, ограничивается НК-клетками и моноцитами/макрофагами; 4) Fc γ RIV существует у мышей, но не у человека; а также 5) Fc γ RIIA, Fc γ RIIC и Fc γ RIIB существуют у человека, но не у мышей [28].

Трансмембранная передача сигналов от Fc γ -рецепторов опосредуется в основном двумя мотивами аминокислотных последовательностей, ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif) и ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), которые сопряжены с активационными и ингибиторными сигнальными путями соответственно. Лучше всего изучен высокоаффинный рецептор Fc ϵ RI, который включает две содержащие ITAM субъединицы, цепь FcR γ и β -цепь Fc ϵ RI, которые функционируют как преобразователи сигналов [29].

Инициирование функции ингибирующих Fc-рецепторов, содержащих ITIM, обычно требует кластеризации рецептора с рецептором, содержащим ITAM, который обеспечивает активность тирозинкиназы, которая в свою очередь фосфорилирует ITIM. Тучные клетки и базофилы экспрессируют в основном низкоаффинные и – реже – высокоаффинные IgG-рецепторы. Детально эти процессы и роль кластеризации изучены на примере Fc γ RIIb. При передаче сигналов с участием ITAM и ITIM используются одни и те же фосфатазы. Однако активная регуляторная передача сигналов включает в себя количественно большую активацию фосфатаз и, следовательно, является более мощной регуляцией. Fc γ RIIb содержит мотив ITIM, который фосфорилируется Lyn (или другими киназами семейства Src), активируемыми совместно агрегированными рецепторами, содержащими ITAM [98]. Другие исследования показали, что передача сигналов через содержащий ITAM Fc γ RIII может приводить к противовоспалительным эффектам, опосредованным функцией фосфатазы SHP-1 [14,70].

1.3. Участие тучных клеток в патогенезе вирусных инфекций

Тучные клетки вовлечены в ответные реакции по ходу всех инфекционно-воспалительных процессов, в том числе вирусного генеза. Обстоятельно изучена роль ТК в ходе инфекций, вызванных вирусами ВИЧ, хантавирусом, реовирусом, риновирусом, вирусом лихорадки Денге (DENV) и вирусом гриппа А [11, 50, 69, 90, 122]. При этих инфекциях ТК продуцируют

нейромедиаторы и цитокины воспаления, которые активируют эндотелий сосудов и привлекают иммунные эффекторские клетки [69, 119]. Активация ТК при вирусных инфекциях происходит под действием медиаторов воспаления, секретируемых клетками эпителия слизистых оболочек (IFN- α , хемокины, IL-33), самих вирусных частиц, а также промежуточных продуктов репликации вируса [50, 90, 122]. Тучные клетки реагируют на прямое воздействие вирусов дегрануляцией и высвобождением преформированных медиаторов. Лейкотриен В4 и протеазы, высвобождаемые тучными клетками, повышают проницаемость сосудов, а синтезируемые TNF- α , IL-6, IFN- α и хемокины рекрутируют NK-клетки и цитотоксические Т-клетки в очаг инфекции [50]. Промежуточные продукты репликации вируса, такие как одноцепочечные или двухцепочечные молекулы РНК, могут быть распознаны мембраносвязанными и эндосомальными TLR (TLR-3, TLR-7/8) и внутриклеточными противовирусными чувствительными элементами (RIG-I, MDA-5) тучных клеток [27]. Двухцепочечная dsРНК, важный промежуточный продукт в репликации вируса, индуцирует экспрессию интерферонов типа 1 и других провоспалительных цитокинов на ранней стадии инфекций денге или гриппа. [53, 140]. TLR-9 тучных клеток может распознавать метилированные участки вирусной ДНК, например, в случае вируса простого герпеса [122]. Кроме того, рецепторы IgG и IgE могут взаимодействовать с ТК путем сшивания с вирусспецифическими антителами и, таким образом, усиливать активацию ТК [122]. Обобщенную картину различных аспектов участия ТК в патогенезе вирусных инфекций представлена на Рис.1.

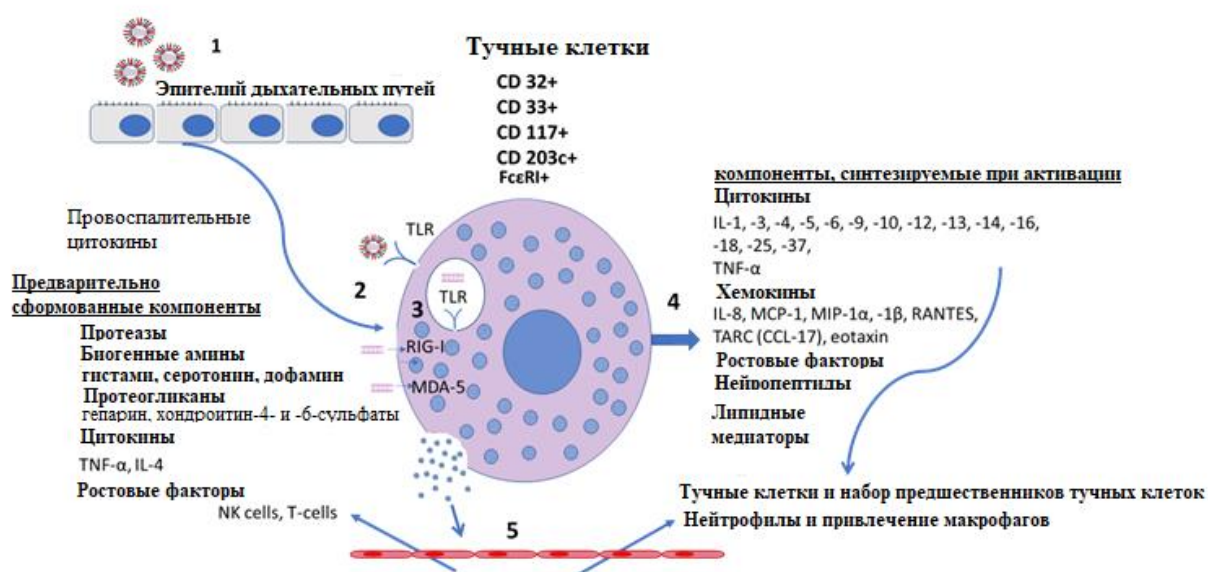


Рис. 1. Вовлеченность тучных клеток в различные этапы патогенеза вирусных инфекций.

1. Вирусное инфицирование эпителиальных клеток сопровождается продукцией провоспалительных цитокинов; 2. Активация тучных клеток подлежащих соединительных тканей провоспалительными цитокинами или непосредственно вирусами; 3. Продукты репликации вирусов (sc- и dc-РНК) распознаются рецепторами RIG-I, MDA-5 и др.; 4. Активация тучных клеток приводит к секреции провоспалительных цитокинов и эффекторных молекул; 5. Эти плеiotропные цитокины обеспечивают каскадное нарастание воспалительного процесса и ответные реакции различных клеток и тканей.

Важно отметить, что общая схема участия тучных клеток в патогенезе вирусных инфекций по основным этапам совпадает с их участием в патогенезе бактериальных инфекций. Результатом в обоих случаях становится синтез и секреция медиаторов воспаления, альтерация тканей, включающая стаз сосудов и формирование отека, привлечение нейтрофилов, эозинофилов с индукцией миграции моноцитов/макрофагов и лимфоидных клеток в сформированный очаг воспаления. В связи с темой исследования анализ роли тучных клеток в очаге воспаления в ходе бактериального процесса, который обстоятельно проведен в литературе, не входит в цели данной работы.

Роль тучных клеток в патогенезе гриппозной инфекции заслуживает самостоятельного анализа. Показано, что ТК активируются при ответе на гриппозную инфекцию, высвобождая гистамин, воспалительные цитокины и противовирусные хемокины, которые участвуют в чрезмерных воспалительных и патологических реакциях в течение заболевания [66, 85, 168, 174]. Роль этих ключевых факторов воспаления (гистамина, цитокинов и хемокинов) изучена наиболее подробно. Также при моделировании на мышах было показано, что ТК могут способствовать патоморфологическим изменениям тканей при инфицировании высокопатогенными штаммами гриппа [66]. Сами ТК также могут инфицироваться вирусами гриппа *in vitro*, при этом сигнальные пути различаются в зависимости от штамма [69; 168]. Стимуляция ТК вирусами гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2 *in vitro* приводила к различной экспрессии генов цитокинов, хемокинов и противовирусных факторов [112]. Дегрануляция ТК при гриппозной инфекции может не быть связана с прямым воздействием dsРНК или ее синтетического аналога Poly I:C, но связана с эффектами высоких концентраций провоспалительных цитокинов [81].

Характер ответных реакций ТК зависит и от штамма вируса гриппа, наблюдаются неодинаковые реакции ТК на штаммы, давно персистирующие в популяции, и штаммы, описанные в последние годы. Так, описана роль ТК при гриппозной инфекции, вызванной штаммом вируса гриппа птиц А/Н7N9. Хотя до 2016 г. вирусы А/Н7N9 приводили к легкому течению заболевания у человека, большинство новых случаев А/Н7N9 сопровождалось тяжелой респираторной инфекцией [17]. Аналогичный феномен может наблюдаться и при заражении пандемическим вирусом А/Н1N1pdm09 [94]. В любом случае, первичное инфицирование происходит в верхних дыхательных путях и сопровождается дегрануляцией связанных с ними тучных клеток. Детально различные аспекты процесса инфицирования изучены на мышинной модели. Мышам обычно вводят вирус гриппа интраназально каплями; также может

использоваться аэрозольная инфекция, которая может быть связана с повышенной заболеваемостью и смертностью [58]. В зависимости от вируса, объема инокулята и уровня седации после интраназальной инокуляции вирус инициирует репликацию в носовых ходах, а затем может спуститься в нижние дыхательные пути, которые и являются основным местом репликации, что вызывает массивную дегрануляцию тучных клеток, что сопровождается развитием пневмонии. Потеря веса, измеряемая ежедневно в течение инфекции, является легко поддающимся количественной оценке параметром используется для оценки заболеваемости. Патологические и гистопатологические признаки отека легких, повреждения эпителиальных клеток и воспаления часто очевидны. Вирусные титры легких обычно используются в качестве показателя репликации вируса, особенно при оценке иммунитета или противовирусного лечения. В зависимости от дозы, смертность (включая эвтаназию, основанную на правилах гуманности) может использоваться в качестве меры тяжести заболевания [90, 99, 107, 111, 113, 123, 150, 153, 160, 169].

Хотя большинство вирусов, заразных для мышей, размножаются преимущественно в дыхательных путях, некоторые вирусы способны к эффективному внелегочному распространению. Одним из факторов, допускающих системное распространение, является наличие многоосновного участка расщепления в НА, который позволяет вирусу размножаться за пределами дыхательных путей. Высокопатогенные вирусы А/Н5N1, которые обычно обладают этим многоосновным участком расщепления, часто демонстрируют системное распространение после нескольких дней заражения, в том числе в мозг [90, 139]. Аналогичным образом, высокопатогенный штамм А/Н1N1 WSN способен распространяться за пределы дыхательных путей [161]. В этих случаях могут наблюдаться неврологические признаки, такие как атаксия и паралич задних конечностей, и заболевание, как правило, приводит к летальному исходу.

Помимо гриппозной инфекции, ТК также имеют большое значение при других сезонных респираторных инфекциях, не связанных с гриппом. Для множественных парамиксовирусов, респираторно-синцитиального вируса (RSV), а также для риновирусов риск развития аллергических заболеваний увеличивается после тяжелых вирусных инфекций [118]. Даже при низком уровне инфицирования человеческие ТК продуцируют несколько хемокинов в ответ на RSV посредством механизмов, которые включают ответы на интерфероны I типа. Такие ответы ТК усиливают рекрутирование эффекторных клеток во время индуцированного RSV заболевания [13]. Было показано, что инфицирование RSV фибробластов легких человека способствует воспалению через механизмы, зависящие от гиалуронидазы, которые усиливают активацию ТК, а также экспрессию протеаз ТК посредством взаимодействия с внеклеточным матриксом [124]. Риновирусная (RV) инфекция тесно связана с обострениями астмы и индукцией высвобождения гистамина и IL-8, а также гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, что было показано уже в первых исследованиях роли ТК при риновирусной инфекции [64]. Влияние вирусов RV14 и RV16 на культуру тучных клеток человека (HMC-1) *in vitro* приводит к усилению выброса гистамина и ранних провоспалительных цитокинов, а также к повышению активности каспазы-3 и запуску апоптоза [64, 86].

1.4. Феномен ADE

Антитела при инфекции и вакцинации могут играть двоякую роль, поскольку могут как обеспечивать защиту, так и способствовать усилению патологического процесса. Такие полярные эффекты антител зависят от многих факторов, включая конкретный эпитоп вируса, наличие его перекрестной реактивности с белками хозяина, характер гликозилирования Fc-фрагмента антител и их способности к активации системы комплемента и др. Частично вирус может использовать ненейтрализующие антитела к поверхностным вирусным белкам для более эффективного проникновения в

клетки-мишени и таким образом усиливать вирусное инфицирование [63]. Нейтрализующие антитела способствуют образованию иммунных комплексов, которые откладываются в пораженных тканях и приводят к усилению воспаления и проявлений заболевания [54, 110]. Такой механизм повышения вирулентности за счет антител и называется антителозависимым усилением (antibody-dependent enhancement, ADE), первое исследование которого относится еще к 1964 г., когда Хоукс и соавторы оценивали уровни антител против арбовирусов [60, 105]. Первоначально характер феномена оставался неясным, пока в 1967 г. на модели *in vitro* не была установлена связь между наличием антител к вирусу и повышением инфекционности [61]. В дальнейшем этот феномен был подтвержден для многих других вирусных инфекций, включая респираторные вирусы, а также последствий вакцинации.

В дальнейшем феномен ADE был описан для множества других вирусных инфекций, как правило, у людей с повторными заболеваниями или у ранее вакцинированных лиц, и проявлялся отягченным течением инфекции, нередко со смертельным исходом. Показано, что ADE развивается благодаря облегченному проникновению вируса, комплексированному с IgG и/или компонентами каскада комплемента, в клетки, несущие рецепторы FcγR и C3R, что повышает его инфекционность [24]. В настоящее время классическим случаем развития ADE считается процесс при вызванной флавивирусом лихорадке Денге, при которой антитело-зависимое усиление является основным фактором, способствующим развитию тяжелой формы заболевания [59, 146].

Первое исследование феномена ADE в патогенезе гриппа появилось в 1980 г. при моделировании на крысах для оценки ответа на гетерологичный вызов после иммунизации [162]. С тех пор для понимания феномена ADE при гриппе был проведен ряд исследований *in vitro*. Так, установлено, что противовирусные антитела с низкой нейтрализующей активностью также могут участвовать в формировании ADE. Во время пандемии гриппа 2009 г.

использование сезонных вакцин и наличие ненейтрализующих антител против A/H1N1pdm09 коррелировало с повышенным риском более тяжелого течения процесса у инфицированных людей [55, 78, 104, 137]. Вакцины против гриппа, инактивированные цельным вирионом, могут обеспечивать частичную защиту от дрейфа вирусов гриппа, но при этом они вызывают ассоциированное с вакциной усиленное респираторное заболевание (VAERD) при заражении антигенным вариантом того же подтипа гемагглютинаина (HA) [45, 121]. При моделировании на свиньях было показано, что обострение пневмонии может быть результатом несоответствия между вакцинным штаммом HA, используемым в инактивированной гриппозной вакцине (ИГВ), и штаммом контрольного заражения [116]. Ранее было показано, что ИГВ подтипа A/H1N2 может обеспечивать только частичную защиту от дрейфующих вариантов подтипа HA у свиней, но также может вызывать VAERD [121, 77].

Влияние иммунизации на течение последующей гриппозной инфекции также изучалось в экспериментах на мышах. Мыши C57Bl/6J получали две дозы субъединичной вакцины внутримышечно с интервалом 4 недели. Через месяц животным вводили сублетальную дозу штамма A/Hong Kong/2/1968 (H3N2). Иммунизированные мыши не проявляли клинических симптомов заболевания, тогда как неиммунизированные животные теряли в массе тела в срок от 3 до 7 дней после вакцинации, но впоследствии выздоравливали. После заражения вирусом A/H5N1 неиммунизированные животные проявляли умеренные признаки болезни в течение 7 дней, после чего выздоравливали. Напротив, у вакцинированных мышей развилась инфекция, сопровождавшаяся критической потерей массы тела через 6-8 дней после заражения, что, по мнению авторов, свидетельствует о существенных нарушениях гомеостаза [20].

Многokrатно показано, что НК-клетки, моноциты/макрофаги экспрессируют FcγRIIIa на своей поверхности, поэтому для их участия в развитии ADE имеются молекулярные основы [28, 155]. Мультимерное

«сшивание» Fc γ RIIIa на поверхности эффекторной клетки приводит к фосфорилированию остатков тирозина в активационных цепочках иммунорецепторов (ITAM) и последующей активации Ca²⁺-зависимой сигнальной системы, вызывающий дегрануляцию и апоптоз инфицированных клеток-мишеней [89, 133, 165]. Эффекторные клетки, позитивные по Fc γ RIIIa, также секретируют важные противовирусные цитокины (IFN γ и TNF α) и β -хемокины (MIP-1 α и MIP-1 β) [39, 115]. Все эти противовирусные цитокины могут способствовать снижению репликации вируса [154]. Тучные клетки мыши также несут на мембране Fc γ RIIIa и отвечают аналогичным образом на связывание через него содержащих IgG иммунных комплексов. Однако прямых экспериментальных оценок последствий связывания иммунных комплексов, содержащих вирус и IgG, до настоящего времени не было проведено, и роль тучных клеток в развитии ADE-синдрома изучена недостаточно.

Таким образом, можно заключить, что тучные клетки как элемент врожденного иммунитета участвуют в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета. ТК являются универсальными клетками, участвующими в сложных процессах запуска и контроля воспаления, обеспечивая прямое воздействие собственных медиаторов и опосредуя регуляторные сигналы нервной и эндокринной систем по ходу воспаления, поддержания гомеостаза и других процессов.

В дыхательных путях ТК являются активными участниками широкого спектра иммунологических механизмов, включая про- и противовоспалительные реакции. ТК участвуют в развитии патологии легких при ряде вирусных инфекций, могут способствовать развитию астмы и других воспалительных и фиброзных заболеваний, таких как хроническая обструктивная болезнь легких и идиопатический фиброз легких.

При ряде вирусных инфекций, включая гриппозную инфекцию, наблюдается эффект антителозависимого усиления, который может стать

важным патофизиологическим механизмом осложнения течения вирусной инфекции. В настоящее время только предполагается, что в развитии ADE могут быть задействованы тучные клетки, реагирующие с антигеном через IgG антитела, однако прямые экспериментальные данные отсутствуют. Активация ТК иммунными комплексами может играть двойственную роль, вызывать как положительные, так и отрицательные последствия. Если положительный эффект состоит в ускорении формирования очага воспаления, ограничении диссеминации патогена, максимальной мобилизации клеток врожденного и приобретенного иммунитета и, как результат, сокращении сроков инфекционного заболевания, то выброс гистамина и других медиаторов воспаления на пике инфекционного процесса в результате усиления дегрануляции ТК может сопровождаться негативными клиническими проявлениями, вплоть до летальности. Формирование содержащих вирус и IgG иммунных комплексов может приводить к развитию ADE, развитие которого приводит к отягчению процесса, нередко со смертельным исходом. Однако вопрос о последствиях связывания циркулирующих вирус-содержащих иммунных комплексов с тучными клетками остается малоизученным, что и составляет одну из главных идей данной работы.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальные животные

В работе использовали 240 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).

2.2. Вирусы гриппа

В работе использовали следующие штаммы вируса гриппа типа А, 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 (в дальнейшем А/Вьетнам/H5N1) и

А/Индонезия/5/2005(H5N1) IDCDC-RG2 (в дальнейшем А/Индонезия/H5N1), полученные из Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), США.

Также в работе были использованы штаммы вируса гриппа типа А:

А/Южная Африка/3626/2013(H1N1)pdm09 (в дальнейшем А/Южная Африка/H1N1pdm09) и

А/Нью Йорк/61/2015 (H1N1)pdm09 (в дальнейшем А/НьюЙорк/Н1N1pdm09), полученные из Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), США.

Все вирусы культивировали в аллантоисной жидкости 10-дневных куриных эмбрионов, полученных от АО «Птицефабрика Синявинская (пос. Назия, Ленинградская область) согласно методике [25], после размножения вирусы аликвотировали и хранили при -70°C .

2.2.1. Получение инактивированного вирусного материала

Инактивированную цельновирионную вакцину готовили как описано ранее [40] на основе штаммов А/Вьетнам/Н5N1 и А/Нью Йорк/61/2015 (H1N1)pdm09 после очистки и концентрирования вирус-содержащей аллантоисной жидкости на ступенчатом (30/60%) градиенте сахарозы. Очищенный вирус в концентрации 20000 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ) на 1 мл 0,14 М раствора NaCl, забуференного фосфатами, рН7,4 (забуференный физиологический раствор, ЗФР) смешивали в соотношении 100:1 с раствором разбавленного в 40 раз ЗФР 37% раствора формальдегида и выдерживали не менее 3 сут при 4°C . Для определения полноты инаktivации 100- и 10-кратные разведения инаktivированного вируса и неразбавленный вирус вводили в аллантоисную полость 10-дневных куриных эмбрионов и инкубировали в течение 2 сут при 33°C . О полноте инаktivации вируса судили по отсутствию его накопления в аллантоисной жидкости по результатам реакции гемагглютинации.

2.3. Получение и оценка активности тучных клеток перитонеального экссудата

В качестве источника тучных клеток использовали перитонеальный экссудат мышей. Для получения максимального объема экссудата, который по литературным данным богат тучными клетками [12, 57], брюшную полость мыши промывали 5 мл ЗФР, который вводили иглой, прокалывая брюшину, но не разрывая ее. Экссудат собирали иглой $0,8 \times 38$ мм, либо путем

небольшого разреза в брюшной полости, из которого экссудат поступал в пластиковую пробирку (Sarstedt, Германия) под действием избыточного давления. По каждой группе из 7 экспериментальных животных экссудаты мышей пулировали. Полученные пулы клеток экссудата двукратно отмывали избытком ЗФР на центрифуге Eppendorf 5810 R при 330g в течение 10 мин при охлаждении до 4°C. Полученные клетки переводили в 10 мл охлажденного до 4°C ЗФР, концентрацию ядерных клеток подсчитывали в камере Горяева. После подсчета рабочую концентрацию ядерных клеток перитонеального экссудата устанавливали равной 2,22 млн/мл (или 1 млн ядерных клеток в 450 мкл ЗФР) при определенной эмпирически по результатам анализа мазков доле ТК в среднем 7-10%. Данную рабочую суспензию в дальнейшем считали суспензией клеток перитонеального экссудата, обогащенной тучными клетками.

2.4. Иммунизация мышей вирусом гриппа

Инактивированный формальдегидом концентрированный вакцинный штамм гриппа А/Вьетнам/Н5N1 использовали для иммунизации мышей внутримышечно в дозе 20 000 ГАЕ на 1 мл в объеме 0,1 мл. Контрольная группа получала аналогичным способом плацебо – равный объем ЗФР.

2.5. Серологические методы

2.5.1. Реакция гемагглютинации (РГА)

РГА проводили в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических реакций (Sarstedt, Германия). Предварительно зараженные вирусами гриппа куриные эмбрионы заранее охлаждали до 4°C в течение 18 ч. Вскрытие производили в стерильных условиях, собирали аллантоисную жидкость и вносили ее в объеме 100 мкл в первые лунки планшета. В остальные лунки вносили по 50 мкл ЗФР. Готовили серийные двукратные разведения аллантоисной жидкости, перенося из лунки в лунку по 50 мкл материала. После завершения титрования во все лунки вносили по 50 мкл 0,75% взвеси куриных эритроцитов. Планшеты инкубировали в течение 20

мин при комнатной температуре. Результаты реакции учитывали после полного оседания эритроцитов в контрольных лунках без разведений аллантоисной жидкости [3]. Результат выражали в виде титра, которым считали последнее разведение аллантоисной жидкости, которое обеспечивало формирование типичного агглютината.

2.5.2. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических реакций с использованием 0,75% суспензии куриных эритроцитов по стандартным методикам [75]. Сыворотки иммунизированных вирусом гриппа мышей предварительно обрабатывали экстрактом нейраминидазы холерных вибрионов (Denka Seiken, Япония) для удаления термостабильных ингибиторов агглютинации. Для удаления термолабильных ингибиторов сыворотки прогревали при 56°C в течение 1 ч. Сыворотки титровали для получения серийных двукратных разведений. Затем 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 гемагглютинирующих антител, тормозящих развитие гемагглютинации куриных эритроцитов, выражали как величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, при котором не формировался типичный агглютинат.

2.6. Метод оценки дегрануляции ТК

В эксперименте в качестве антигенов, формирующих комплексы с антителами класса IgG, использовали вирусы гриппа А/Вьетнам/Н5N1 и А/Нью Йорк/Н1N1pdm09, очищенные ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте сахарозы 30/60%. В соответствии с задачами по работе данный метод был использован для проверки гипотезы о возможной дегрануляции ТК при проведении сигнала через Fcγ-рецепторы, поэтому ТК

были нагружены иммунными комплексами, содержащими IgG-антитела против вирусов гриппа и сами вирусы гриппа разных штаммов. Источником вирус-специфических IgG служили сыворотки мышей СВА, иммунизированных теми же вирусами по методике, описанной в разделе 2.4.

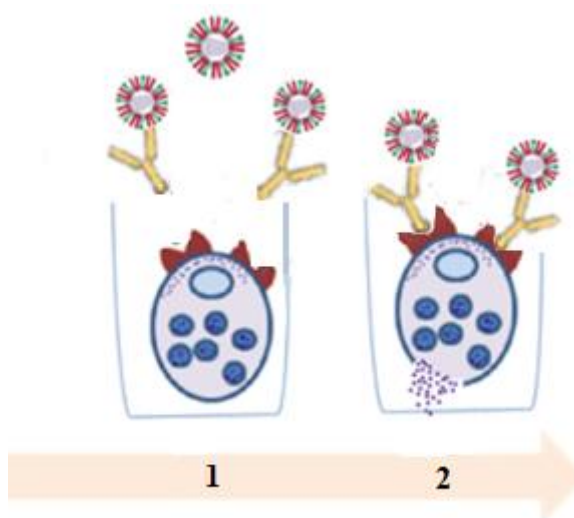


Рис. 2. Этапы эксперимента по оценке дегрануляции *in vitro* клеток перитонеального экссудата мышей, сенсibilизированных противовирусными IgG-антителами

1) Нагрузка Fcγ-рецепторов тучных клеток комплексами, содержащими противовирусные IgG-антитела и антигены (вирусы гриппа); 2) релизинг гистамина из тучных клеток.

В качестве модели иммунных комплексов, сформированных антителами класса IgG, использовали официальные 1%-е препараты сывороточного гамма-глобулина человека (Гамма-глобулин человеческий противогриппозный, Россия), подвергнутые прогреванию при 56°C в течение 30 мин. Другими использованными иммунными комплексами были частицы вируса A/H5N1, комплексированные с мышинными антителами против данного штамма. Формирование и наличие противовирусных IgG-антител в образцах сывороток было доказано экспериментально. Частицы вируса гриппа штамма

A/H5N1 инкубировали с антисывороткой против данного штамма вируса гриппа в течение ночи при 4°C. Образцы сывороток, содержавшие комплексы вирусных частиц и IgG-антител вносили в культуры в объеме 50 мкл и инкубировали с клетками и антителами в течение 40 мин при 37°C. Одним из контролей служило внесение в культуры ТК изолированных частиц вируса гриппа штамма A/H5N1 без антител.

В качестве источника ТК использовали перитонеальный экссудат мышей. Экссудаты по каждой группе из 7 животных, полученные после промывания брюшной полости 5 мл ЗФР, пулировали и после двукратной отмывали избытком охлажденного ЗФР устанавливали концентрацию ядерных клеток равной 2,22 млн/мл при средней доле ТК в 7-10%. Дегрануляцию ТК индуцировали путем внесения иммунных комплексов, содержавших вирус-специфичные IgG и вирусы разных штаммов на 40 мин при 37°C. Степень их дегрануляции оценивали по методу Шора (см. раздел 2.8.), основанному на формировании люминесцентного продукта конденсации гистамина при взаимодействии с ортофталевым альдегидом (ОФА, 500 нг/мл) при длинах волн 355/460 нм. Уровень флюоресценции образцов после смешивания 200 мкл супернатанта и 25 мкл раствора ОФА 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.

2.7. Метод оценки концентрации гистамина в супернатанте

Концентрацию гистамина, высвобожденного клетками перитонеального экссудата в супернатант, оценивали с использованием модифицированного метода Шора [136]. Метод основан на обработке флюоресцентного продукта конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом (ОФА). В эппендорфы

отбирали по 200 мкл супернатантов. К ним добавляли по 40 мкл 1М NaOH, закрывали эппендорфы и содержимое перемешивали на шейкере 15-30 сек. Под контролем таймера добавляли ОФА, а затем через 4 мин останавливали реакцию, добавляя 3М HCl по следующей схеме: в 1-й эппендорф вносили 25 мкл ОФА, через каждые 10 секунд тот же объем ОФА добавляли в каждый следующий эппендорф. Через 4 мин после внесения ОФА в 1-й эппендорф в него вносили 20 мкл 3М водного раствора HCl и также через каждые 10 секунд 20 мкл 3М HCl вносили в последующие пробы. Измеряли флюоресценцию в образцах в светозащищенных планшетах (Corning-Costar, США) на флюороскане Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL (США) при длинах волны возбуждения $\lambda_{в}=355$ нм и эмиссии $\lambda_{э}=450$ 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.

2.8. Метод оценки концентрации гистамина в тканевых образцах

Для оценки уровня высвобожденного из тучных клеток гистамина в образцах легких мышей с экспериментальной гриппозной инфекцией использовали наборы EIA Histamine (Beckman Coulter, США). Получение тканевых гомогенатов, оценку уровня гистамина в них проводили по рекомендации производителя методом иммуноферментного анализа. Уровень гистамина в парных образцах каждого супернатанта определяли по калибровочной кривой и выражали в нг/мл.

2.9. Оценка роли тучных клеток при экспериментальной гриппозной инфекции мышей

В качестве модели инфекционного процесса и оценки патофизиологических последствий дегрануляции тучных клеток использовали модель экспериментальной гриппозной инфекции. Параллельно в ходе работы

изучали реакции тучных клеток у невакцинированных и вакцинированных животных.

Инактивированный штамм гриппа А/Вьетнам/Н5N1 (см. раздел 2.2.) использовали в качестве вакцинного штамма для внутримышечной иммунизации мышей в дозе 20000 ГАЕ в объеме 0,1 мл. Контрольная группа получала таким же способом ЗФР в том же объеме. Сыворотки крови отбирали на 7, 12, 14 и 21-й дни после иммунизации и хранили при температуре -20°C до проведения серологических тестов.

На 14-й день после иммунизации мышей интраназально инфицировали LD50 вируса, которая составляла $10^{4,5}$ эмбриональной инфекционной дозы (EID50) для вируса гриппа А/Индонезия/Н5N1 или 10^5 EID50 для вируса А/Южная Африка (H1N1)pdm09 в объеме 50 мкл, равномерно распределяя между ноздрями [40]. Общая схема эксперимента приведена на рис.3.



Рис. 3. Общая схема экспериментов по оценке роли тучных клеток при гриппозной инфекции

В эксперименте также использовали очищенный ультрацентрифугированием вирус гриппа А/Н5N1, иммунные сыворотки

мышей СВА, содержащие IgG-антитела к гемагглютинирующему вирусу гриппа H5, кроличью антисыворотку к IgG мыши (ИМТЕК, Москва), очищенные крысиные моноклональные антитела против IgE мыши (клон R35-72) (BD Pharmingen, США) в качестве положительного контроля.

2.10. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) был проведен для определения сывороточных антител IgG, IgG1, IgG2a и IgG3 против А/Индонезия/H5N1 в 96-луночных микропланшетах (Sarstedt, Германия), а также уровней гистамина и триптазы в надосадках [130]. При этом для оценки продукции IgG, IgG1, IgG2a подбор антител и условий реакции производили самостоятельно, а для оценки уровней гистамина и триптазы использовали коммерческие наборы: EIA Histamine (Beckman Coulter, США); Mouse Mast Cell Tryptase ELISA Kit производства MyBioSource (США)

При конструировании тест-системы для оценки методом прямого ИФА сывороточных концентраций противогриппозных IgG, IgG1, IgG2a и мыши использовали в качестве антигена 20 ГАЕ/0,1 мл цельного очищенного вируса А/H5N1, который наносили на пластик в 96-луночных плоскодонных планшетах Sarstedt (Германия). После инкубации при 4°C во влажной атмосфере в течение 12-16 ч лунки тщательно трехкратно промывали, а открытые валентности блокировали буфером, содержащим 0,05% Tween 20 на ЗФР с добавлением 4% (v/v) фетальной телячьей сыворотки. Последующие этапы ИФА включали внесение в лунки тестируемых образцов мышиных сывороток в дублях, ряд последовательных инкубаций и промывок, нанесение проявляющих кроличьих антител, специфичных к IgG, IgG1, IgG2a мыши (Sigma, США), повторные отмывки и идентификацию связывания проявляющих антител с помощью антивидовых конъюгатов, меченых пероксидазой хрена. Для идентификации результатов реакции использовали раствор ТМВ. После остановки реакции внесением 20 мкл 2М H₂SO₄ оптическую плотность растворов определяли на многоканальном

спектрофотометре BioTek (США) при 450 нм. Калибровочные кривые строили с использованием в качестве антител коммерческих препаратов IgG, IgG1, IgG2a мыши Sigma (США).

Результаты выражали в десятичных логарифмах величины, обратной конечному разведению. За конечное разведение принимали наивысшее разведение образца сыворотки, дающее оптическую плотность при длине волны 450 нм (OD450), превышающую среднюю оптическую плотность в контрольных образцах более чем на 3 стандартных отклонения.

Метод непрямого ИФА также был использован для определения уровня тучноклеточной триптазы в образцах ткани легких мышей с экспериментальной гриппозной инфекцией. В работе использовали Mouse Mast Cell Tryptase ELISA Kit производства MyBioSource (США). Получение тканевых гомогенатов, оценку уровня триптазы в них проводили по рекомендации производителя. Также использовали метод конкурентного ИФА для оценки уровня гистамина в тканевых экстрактах (см. п.2.8.).

2.11. 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, включающей проводку материала через спирты повышающейся концентрации и ксилол. Срезы толщиной 5-7 мкм депарафинировали и окрашивали стандартными гистологическими красителями, метакроматическим красителем толуидиновым синим для выявления тучных клеток, а также мечеными пероксидазой моноклональными антителами к CD117 (R&D Systems Inc., США). Для контрастирования срезы всегда окрашивали гематоксилин-эозином.

2.12. Оценка влияния антигистаминных препаратов

Для оценки роли гистамина в развитии противовирусного инфекционного

процесса части животных после инфицирования вирусами гриппа 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, но получившие равный объем ЗФР.

2.13. Статистические методы

Предварительную обработку данных проводили с помощью лицензионной программы Microsoft Excel. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Для построения графиков и определения различий между независимыми группами использовалась программы Origin2019b (Origin Lab., США) и 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 распределения использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Для сравнения нескольких независимых групп использовали тест Крускала-Уоллиса. Анализ кривых выживаемости Каплана-Мейера проводили с помощью непараметрического лог-ранкового критерия Мантела-Кокса. Во всех случаях статистически значимыми считали различия между выборками при $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Получение противогриппозных антител

3.1.1. Иммунизация и ее результаты

Иммунизацию мышей проводили в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.4. Животным внутримышечно вводили инактивированные вирусы гриппа А/Вьетнам/Н5N1 и А/Индонезия/Н5N1. Уровни антител в сыворотке крови оценивали через 12 дней после иммунизации. Результаты исследования вирусоспецифических сывороточных антител в РТГА и ИФА представлены на рис. 4 и 5.

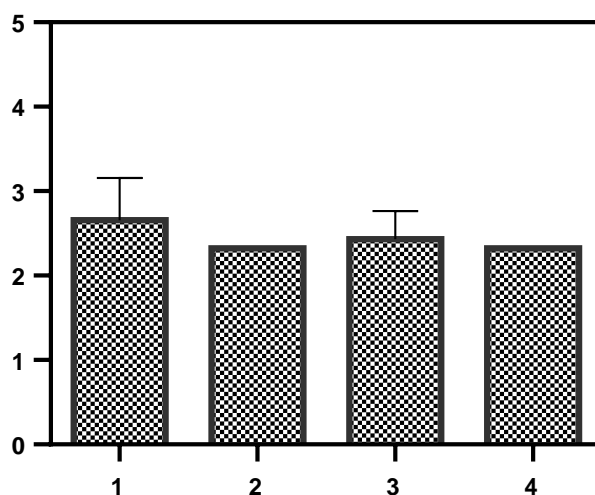


Рис. 4. Уровни антител в сыворотке крови мышей после иммунизации штаммом вируса гриппа А/Вьетнам/Н5N1 на 12-е сутки после иммунизации по результатам РТГА

По оси абсцисс: группы, 1 – вакцинальная группа, антитела к штамму А/Вьетнам/Н5N1; 2 - контроль (введение ЗФР), антитела к штамму А/Вьетнам/Н5N1; 3 – вакцинальная группа, антитела к штамму А/Индонезия/Н5N1 штамм А/Вьетнам/Н5N1, 4 – контроль (введение ЗФР), антитела к штамму А/Индонезия/Н5N1. По оси ординат: значение титра, – $\log_2 X$, где X – последнее разведение сыворотки в РТГА, тормозившее гемагглютинацию. $M \pm m$, число наблюдений по каждой точке – не менее 9.

Из приведенных на рис. 4 результатов видно, что парентеральная иммунизация штаммом вируса гриппа А/Вьетнам/Н5N1 не приводила к достоверному повышению титра антигемагглютинирующих антител ни к гомологичному, ни к дрейфовому вирусу, при этом средние титры антител были ниже защитного уровня 1:40, который традиционно рассматривается как обеспечивающий 50%-е снижение риска заражения гриппом.

Для указанных штаммов в ИФА была проведена оценка уровней вирус-специфических IgG различных подклассов, результаты которой приведены на рис.5.

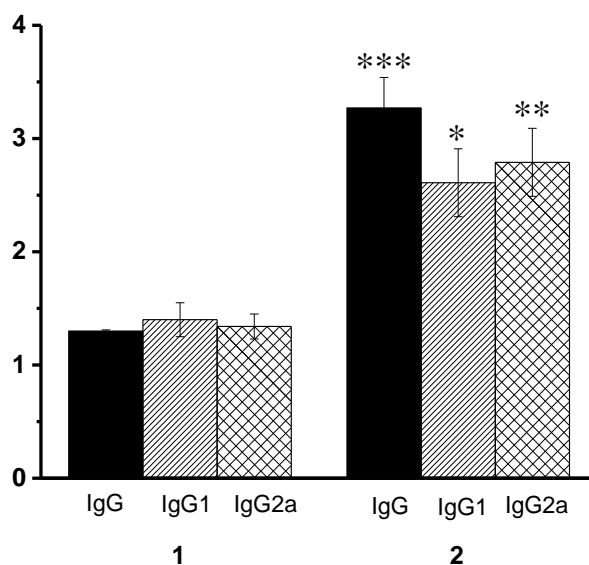


Рис. 5. Уровни IgG и его подклассов, специфичных к штамму А/Индонезия/Н5N1 в сыворотке крови мышей после иммунизации штаммом вируса гриппа А/Вьетнам/2004/(Н5N1) на 12-е сутки после иммунизации по результатам ИФА

По оси абсцисс: группы, 1 – контроль (введение ЗФР), 2 – иммунизация штаммом А/Вьетнам/Н5N1. По оси ординат: значение титра, $-\lg X$, где X – последнее значение OD450, превышающее OD контроля конъюгата на 3 стандартных отклонения. $M \pm m$, 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 тесту Манна-Уитни.

Приведенные на рис.5 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). Этот прирост был гораздо более выражен, чем антигемагглютинирующая активность сыворотки после иммунизации (рис.4). На основании полученных данных можно предполагать, что на 12-е сутки после иммунизации вирусом гриппа основная противовирусная активность связана именно с IgG-антителами, что соответствует литературным данным о переключении классов синтезируемых антител с IgM на IgG после 5-6 суток иммунного ответа.

На рис. 6 приведены результаты изучения динамики IgG-антител против штамма А/Индонезия/Н5N1 после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1. Это исследование было важным с точки зрения подтверждения гипотезы о пригодности штамма А/Вьетнам/Н5N1 в качестве базового вакцинного штамма и его соответствия методикам оценки роли тучных клеток в инфекционном процессе. Как показано на рис. 6, средние уровни всех подклассов IgG были значительно выше таковых в группе интактных невакцинированных мышей уже на 7-й день после иммунизации. Уровни сывороточных IgG к вирусу гриппа А/Индонезия/Н5N1 на 21-й день были значительно выше, чем на 14-й день после иммунизации. Уровни IgG2a не изменялись после 7 дня к 14 и 21 дню. Только IgG3 на 7-й день после иммунизации статистически достоверно не отличались от таковых в группе интактных невакцинированных мышей и значительно возрастали к 14-му дню.

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 изоотипы, взаимодействующие со штаммом А/Индонезия/Н5N1, в том числе способные к взаимодействию с различными Fcγ-рецепторами на поверхности тучных клеток.

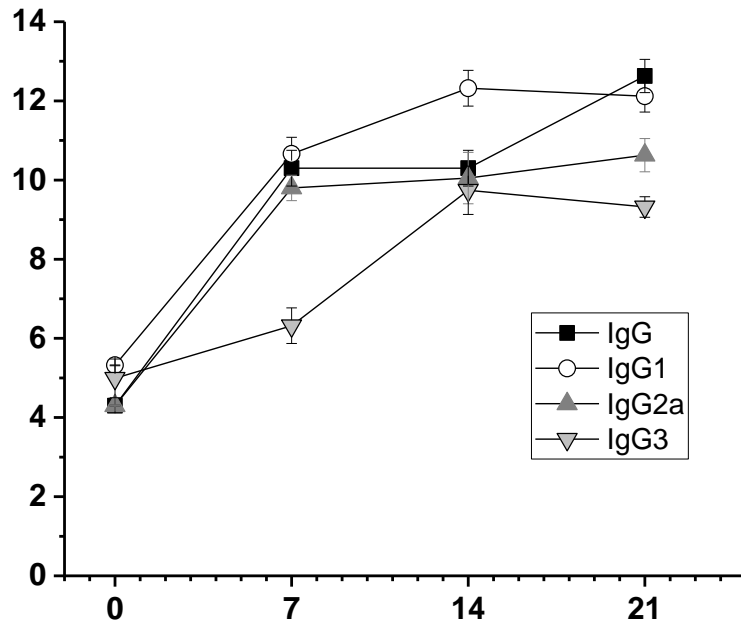


Рис.6. Динамика уровней IgG и его подклассов, специфичных к штамму А/Индонезия/Н5N1, в сыворотке крови мышей после иммунизации штаммом вируса гриппа А/Вьетнам/Н5N1 по результатам ИФА.

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.

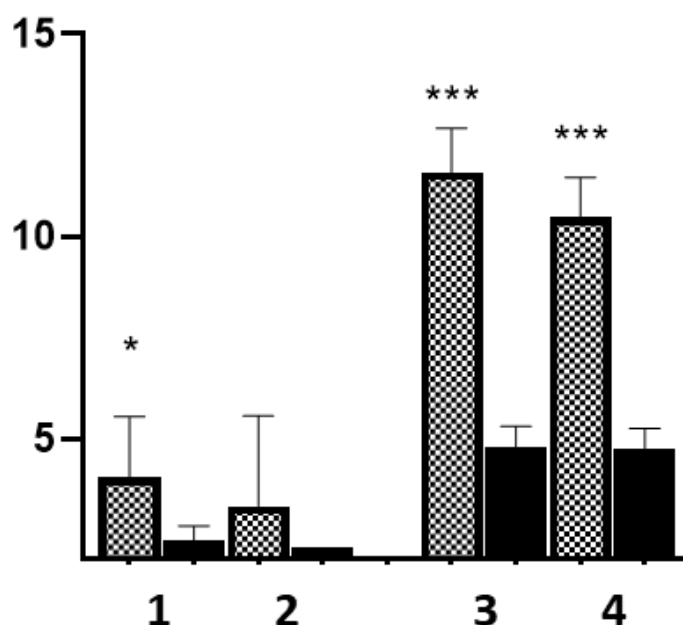


Рис. 7. Уровни антигемагглютинирующих антител по результатам РТГА и вирус-специфических IgG к вирусам А/Нью Йорк/Н1N1 pdm09 и А/Южная Африка/Н1N1pdm09 по результатам ИФА на 12-й день после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09. По оси абсцисс: 1 – результаты РТГА к вирусу А/Нью Йорк/Н1N1 pdm09; 2 – 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.

При смене пары вакцинного и инфекционного штаммов со штаммов А/Н5N1 на А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 и А/Южная Африка/Н1N1pdm09, 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 антигемагглютинирующих антител, 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.

3.1.2 Определение содержания инфекционного вируса в легких после экспериментальной инфекции заражающими вирусами, на 14 день после иммунизации

На рис. 8 приведены результаты оценки содержания инфекционных штаммов в легких после иммунизации вакцинными штаммами вируса гриппа.

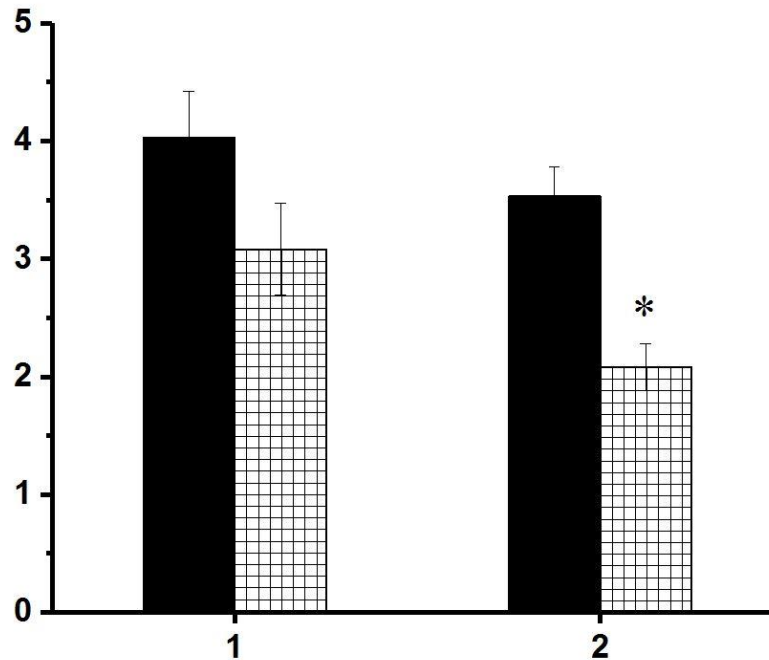


Рис. 8. Содержание вирусов инфекционных штаммов (1 - А/Индонезия/Н5N1; 2 - А/Южная Африка/Н1N1pdm09 после экспериментальной инфекции.

По оси абсцисс: 1 – контроль (введение ЗФР, черный столбик) и иммунизация штаммом А/Вьетнам/Н5N1 (штрихованный столбик); 2 – контроль (введение ЗФР, черный столбик) и иммунизация вакцинным штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 (штрихованный столбик). По оси ординат: инфекционный титр вируса в легких, – \lg_{10} ЭИД₅₀/мл, $n=5$ по каждой точке.

В обоих случаях подсчет числа вирусных частиц в легких производили на 14-е сутки после парентеральной иммунизации и через 24 ч после интраназального введения инфекционного штамма. Из рис. 8 видно, что иммунизация штаммом А/Вьетнам/2004(H5N1) с последующим инфицированием штаммом А/Индонезия/2005(H5N1) приводила практически к такому же уровню вируса в ткани легких, как и введение физиологического раствора, принятого в качестве контроля ($p > 0,05$). В то же время вакцинный штамм А/Нью Йорк/H1N1pdm09 обеспечивал достоверное снижение содержания частиц вируса инфекционного штамма А/Южная Африка/H1N1pdm09 в легких по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таким образом, в случае обеих пар вакцинного и инфекционного штаммов у животных отмечались как протективные антитела (главным образом, класса IgG) в крови, так и наличие вируса в ткани легких. Оба фактора могли оказывать определенное влияние на дегрануляцию тучных клеток.

3.2. Оценка дегрануляции ТК, опосредованной антителами класса IgG, *in vitro*

3.2.1. Результаты морфологического исследования

Эксперименты *in vitro* проводились с пулом клеток перитонеального экссудата мышей, в котором доля ТК составляла около 10% (рис.9). Другими клеточными морфотипами были лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы. Дегрануляцию ТК в составе перитонеального экссудата, индуцировали иммунными комплексами, включавшими противовирусные IgG-антитела и специфичный для этих антител антиген.

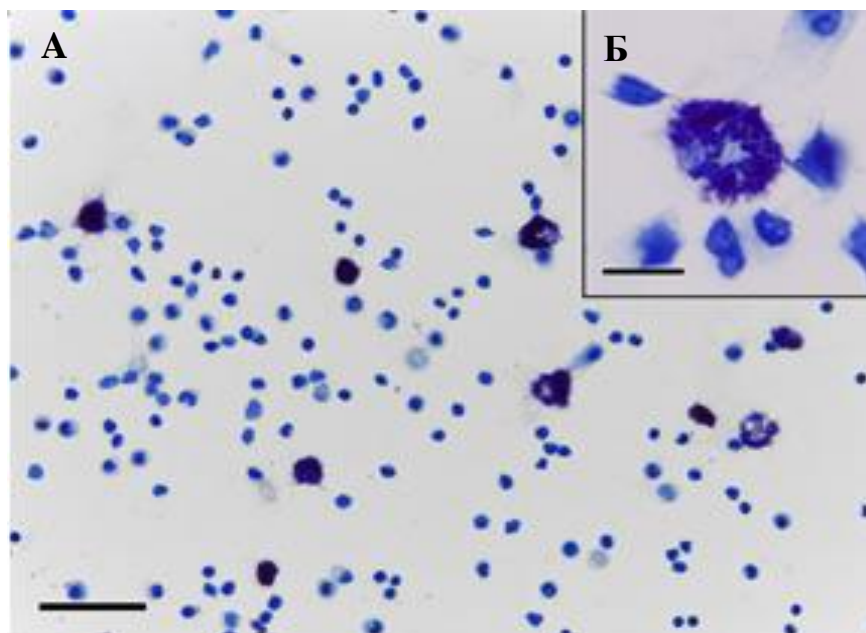


Рис.9. Тучные клетки в составе перитонеального экссудата мыши

А – общий вид мазка клеток перитонеального экссудата, объектив 40×, масштабная линейка 50 мкм; Б – одиночная тучная клетка с признаками начальной стадии дегрануляции, объектив 100×, масштабная линейка 10 мкм. Окрашивание толуидиновым синим.

3.2.2. Доказательства возможности дегрануляции ТК под действием содержащих IgG иммунных комплексов

Однако сам факт возможности дегрануляции ТК под действием иммунных комплексов, содержащих IgG, требует специальных доказательств. С этой целью была проведена серия специальных экспериментов. Как известно, несвязанный с антигеном мономерный IgG любого подкласса, в отличие от IgE, не связывается с мембранным Fcγ-рецептором, и обретает эту способность после комплексования с лигандом. Напротив, IgE связывается с мембранным Fcε-рецептором только в мономерной форме, без связывания с лигандом. Этот известный из литературы феномен нашел полное подтверждение при инкубации клеток перитонеального экссудата, обогащенных ТК, с мышинными сыворотками, полученными после иммунизации животных одним из штаммов вируса гриппа. Результаты

приведены на рис. 10.

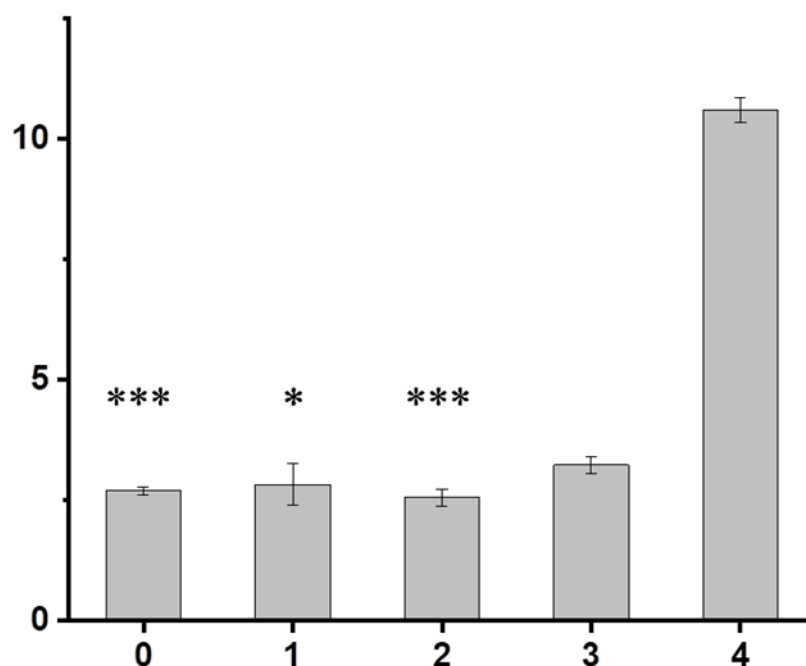


Рис.10. Уровни секреции гистамина после инкубации ТК с вирус-специфическими IgG-содержащими иммунными комплексами по сравнению со стимуляцией анти-IgE-антителами. По оси абсцисс - группы: 0 – контроль (ЗФР), 1 – инкубация ТК с частицами вируса A/H5N1, 2 – инкубация ТК с мышинной антисывороткой к вирусу гриппа A/H5N1, 3 – инкубация ТК с мышинной антисывороткой к вирусу гриппа штамма A/H5N1 и частицами вируса A/H5N1, 4 - инкубация ТК с мышинной антисывороткой к вирусу гриппа A/H5N1 с последующим добавлением антисыворотки к мышинному IgE. По оси ординат - продукция гистамина, усл. ед. Число наблюдений равно 10 по каждой точке.

Из приведенных на рис.10 результатов видно, что IgE связывается с мембранными Fcε-рецепторами, что проявляется самым высоким выбросом гистамина после связывания с анти-IgE-антителами (столбец 4). Из данных литературы известно, что IgE связывается с клеточными Fcε-рецепторами только до связывания с антигеном и, более того, обретает способность связывать антиген только после комплексования с Fcε-рецепторами. Выброс гистамина в контрольных культурах также имел место (столбцы 0 и

1), и мог быть связан с активацией ТК в результате пробоподготовки. Примечательно, что само по себе внесение мышинной антисыворотки, содержащей IgG-антитела против вируса штамма А/Н5N1 (столбец 1), не вызывало дополнительной активации ТК по сравнению с негативным контролем (столбец 0). Это еще раз подтверждает известный из литературы факт, по которому несвязавшиеся с антигеном молекулы IgG не могут связываться с Fcγ-рецепторами на поверхности любых клеток. Внесение вирусных частиц в дозировке 50 ГАЕ также не приводило к высокому выбросу гистамина (столбец 2). Однако внесение комплексированных с IgG вирусных частиц (столбец 3) приводило к достоверному (по сравнению со столбцами 0-2) повышению выброса гистамина на 15-27% по сравнению с разными контролями. Этот результат подтверждает как факт связывания молекул IgG с мембранными Fcγ-рецепторами только после формирования иммунного комплекса, так и возможность стимуляции ТК через Fcγ-рецепторы. При этом, уровень секреции гистамина при проведении сигнала через Fcγ-рецепторы оказывается в 3 раза ниже, чем при связывании Fcε-рецепторов (столбец 4).

Между тем, результаты, приведенные на рис.11, доказывают выброс гистамина из тучных клеток после их связывания с содержащими IgG комплексами антиген-антитело на примере агрегированного IgG.

Из приведенных на рис.11 результатов видно, что 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, оцененная по методу Шора, 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 преформированный гистамин в гранулах и способны его секретировать при дегрануляции.

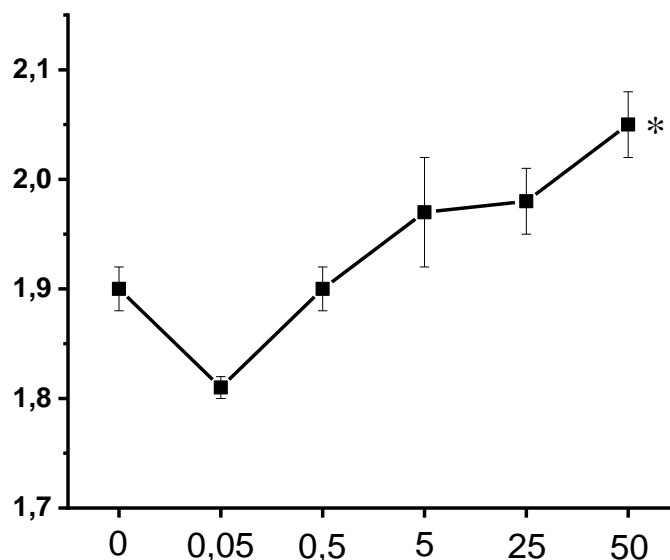


Рис. 11. Оценка продукции гистамина клетками перитонеального экссудата под действием различных концентраций агрегированного IgG.

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.

3.2.3. 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). Важно, что иммунные комплексы были сформированы заранее, до внесения к клеткам, чтобы предотвратить возможное связывание IgG с рецепторами на поверхности ТК. Результаты

приведены в табл. 1. Из приведенных данных видно, что при дозе вируса 5 ГАЕ ни в одном случае не было отмечено достоверного выброса гистамина по сравнению с отрицательным контролем, которым служило добавление ЗФР. При переходе к дозе вируса 50 ГАЕ в случае штамма А/Вьетнам/Н5N1 при формировании 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 1

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 мышьяных антисывороток не вызывали выброса гистамина, достоверно отличающегося от контроля. Более того, если именно иммунные комплексы, сформированные частицами вируса и разведением 1:300 антисыворотки вызывали достоверный выброс гистамина, то дальнейшее разведение антисыворотки до

1:900 приводили к исчезновению эффекта и показатель не отличался от негативного контроля ($3,71 \pm 0,25$ против $3,26 \pm 0,89$ в отрицательном контроле, $p > 0,05$). Также достоверных отличий от негативного контроля, равно как и от введения одиночных разведений противовирусной антисыворотки или иммунных комплексов не отмечено в случае использования пары вируса гриппа А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 и специфичной к нему антисыворотки (табл.1).

3.3. Оценка уровня дегрануляции ТК в легких в ответ на заражение животных вирусом гриппа

3.3.1. Сывороточные уровни гистамина и триптазы в ответ на гриппозную инфекцию

В ходе данного раздела работы сопоставляли ответные реакции ТК на введение инфекционного штамма вируса гриппа и на тот же штамм вируса на фоне предшествующей иммунизации мышей. Сопоставляемыми параметрами при этом были избраны сывороточные уровни гистамина и фермента гранул тучных клеток – триптазы, участвующей в ремоделировании матрикса очага воспаления по ходу воспаления и после него, при переходе к репаративным реакциям. Сывороточные уровни гистамина и триптазы в этих исследованиях оценивали методом иммуноферментного анализа.

На рис. 12 представлены результаты сопоставления сывороточных уровней гистамина у интактных мышей (контроль), у мышей, получивших инъекцию физраствора вместо иммунизации (невакцинированная группа, НВ) и у мышей, получивших вакцинный штамм А/Вьетнам/Н5N1 (вакцинированная группа, ВАК) за 14 дней до инфицирования. Все три группы на 15 день были заражены штаммом А/Индонезия/Н5N1. Результаты учитывали на 8-й день после инфицирования, согласно схеме эксперимента, приведенный на рис.2 (Глава 2).

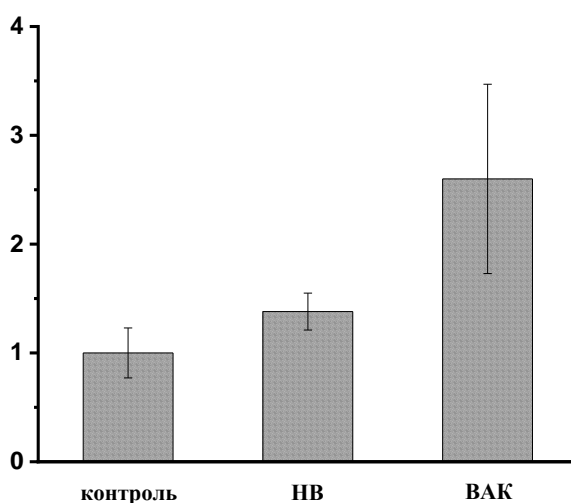


Рис. 12. Уровень гистамина в сыворотке крови мышей разных групп на 8-й день после инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1.

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 в сыворотке крови по результатам ИФА, нг/мл. $M \pm m$, число наблюдений по каждой точке – не менее 4.

Приведенные на рис.12 результаты показывают, что содержание гистамина в сыворотке крови имеет тенденцию к нарастанию с повышением антигенной нагрузки. Так, введение инфекционного штамма вируса гриппа А/Индонезия/Н5N1 интактным животным (контроль) соответствует уровню гистамина в сыворотке крови равному $1,00 \pm 0,23$ нг/мл. Предварительное ЗФР, в объеме, равном объему вакцины, сопровождалось уровнем гистамина в сыворотке, равном $1,38 \pm 0,17$ нг/мл, а по ходу иммунного ответа на введение инфекционного штамма вируса гриппа после предварительной иммунизации вакцинным штаммом А/Вьетнам/Н5N1 за 14 дней до инфицирования уровень гистамина в сыворотке крови мышей составлял уже $2,60 \pm 0,87$ нг/мл. И хотя

эта тенденция не была статистически достоверной ($p > 0,05$ по критериям t Стьюдента и z -критерию), она полностью соответствовала приведенным выше результатам оценки секреции гистамина в экспериментах *in vitro*.

Однако при оценке сывороточного уровня триптазы - фермента из других гранул тучных клеток (δ -гранулы), отличных содержащих гистамин α -гранул, на фоне ответа на инфицирование вирусом гриппа, были найдены совершенно другие закономерности (рис. 13).

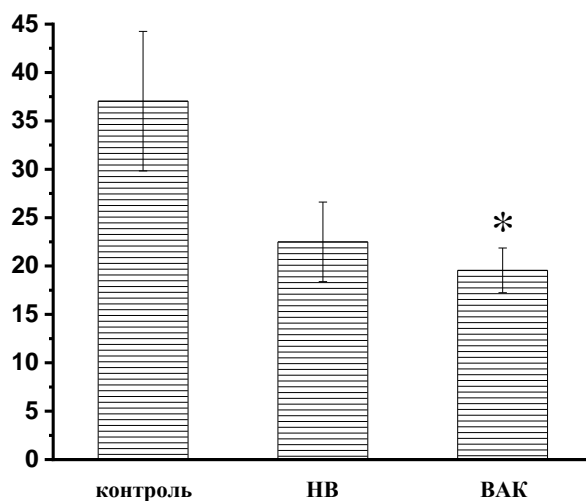


Рис.13. Уровень триптазы в сыворотке крови мышей разных групп на 8-й день после инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1.

По оси ординат: концентрация триптазы в сыворотке крови по результатам ИФА, нг/мл. Все остальные обозначения совпадают с рис. 12.

Из данных на рис.13 видно, что 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). В случае предварительного введения физиологического раствора вместо вакцинного

штамма продукция триптазы сокращается до $22,50 \pm 4,11$ нг в 1 мл сыворотки крови, а после инфицирования иммунизированных животных ее уровень достоверно снижается до $19,56 \pm 2,31$ нг/мл ($p < 0,05$). Подробный анализ этого важного результата будет представлен в Главе 4, хотя сразу можно отметить, что он может быть связан с различными сигнальными путями от мембранных иммуноглобулиновых рецепторов тучных клеток и различным патофизиологическим значением продукции гистамина и триптазы тучными клетками.

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

Предположение о том, что тучные клетки участвуют в инфекционном процессе у иммунных мышей, было подтверждено при гистологическом исследовании легких, результаты которого представлены на рис. 14 – 22.

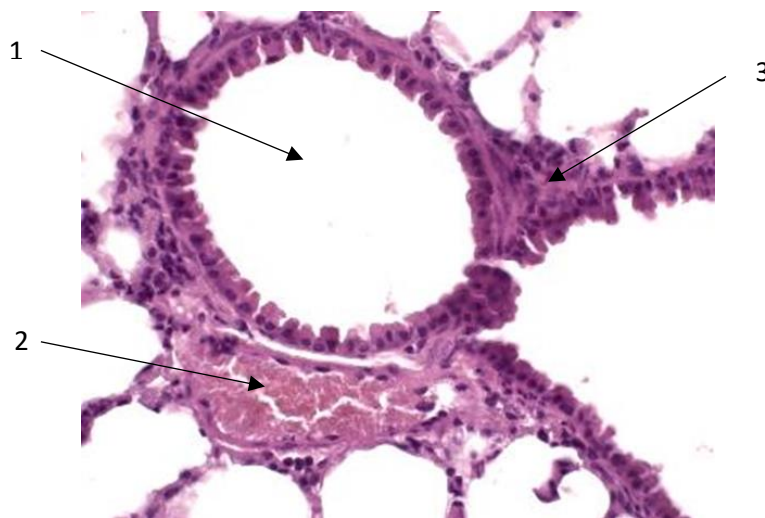


Рис. 14. Мелкий бронх и перибронхиальная рыхлая соединительная ткань. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увеличение 200×. 1- просвет мелкого бронха; 2 – кровеносный сосуд, вена; 3 – скопление лимфоидных клеток.

Видно, что стенка мелкого бронха уже не содержит хрящевых элементов и представлена тонким слоем гладких мышц. Полость бронха (стрелка 1) выстлана однослойным кубическим, лишенным ресничного аппарата

эпителием, что подтверждает правильность позиционирования структуры как мелкого бронха. На границе гладкомышечного слоя (на 6 часах на препарате) лежит срез участка кровеносного сосуда, заполненного эритроцитами (стрелка 2). Вероятно, этот сосуд является мелкой веной, на это указывает деформированность его формы и тонкие стенки. Справа, примерно на 2-х часах, расположено скопление клеток соединительной ткани, обогащенное клетками с морфологией лимфоцитов (стрелка 3).

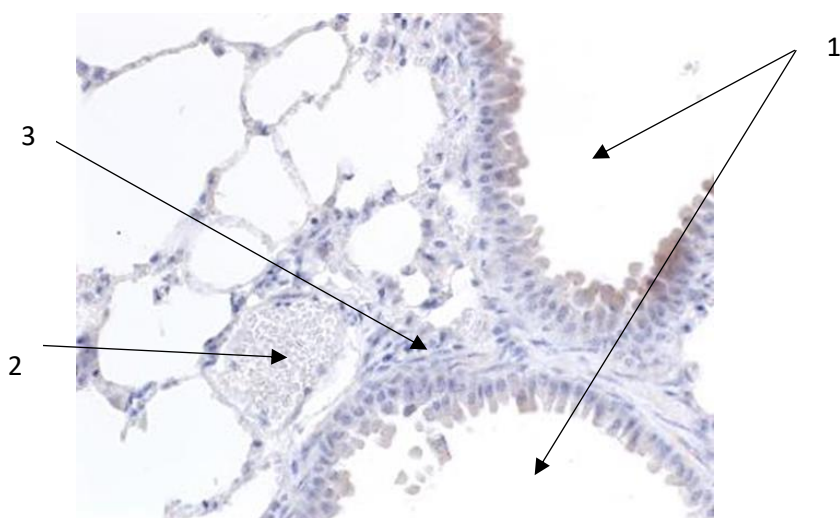


Рис. 15. Граница двух мелких бронхов и скопление лимфоидных клеток в перибронхиальной ткани. Окрашивание азуром II. Увеличение 200×. 1 – просветы двух мелких бронхов; 2 – кровеносный сосуд в перибронхиальном пространстве; 3 – скопление лимфоидных клеток в перибронхиальном пространстве между двух бронхов.

Небольшие скопления неинкапсулированной лимфоидной ткани, ассоциированной с бронхами, отмечаются по всему ходу нижних дыхательных путей. Как правило, рядом всегда расположены кровеносные сосуды (рис. 15).

Однако некоторые скопления лимфоидной ткани могут быть окружены очень тонкой капсулой, либо могут занимать нишу, сформированную компонентами рыхлой соединительной ткани. Подчас скопления

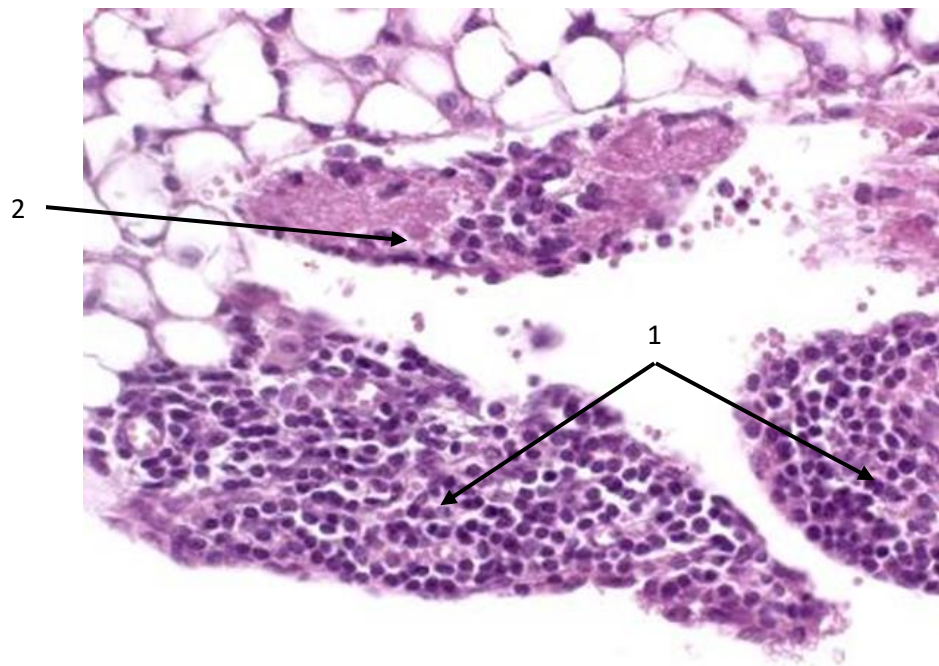


Рис. 16. Скопления лимфоидной ткани в перибронхиальном пространстве. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение 200×. 1 – бронх-ассоциированная лимфоидная ткань; 2 – кровеносные сосуды.

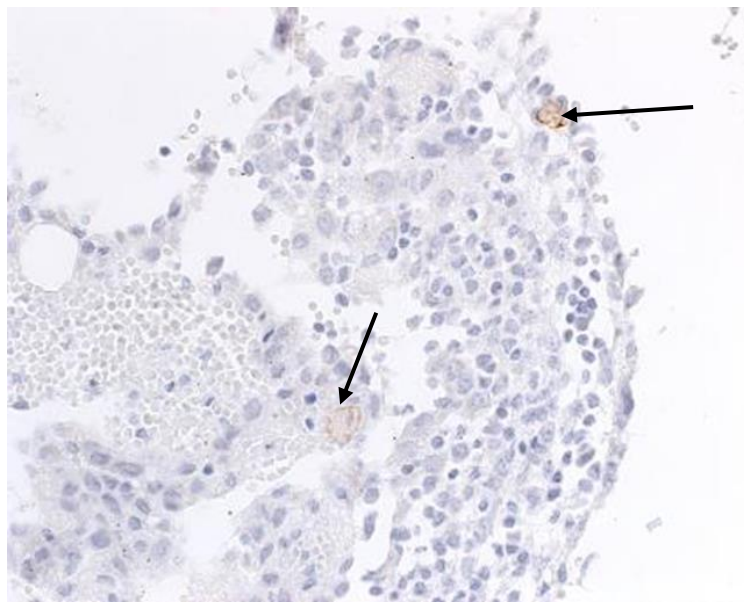


Рис.17. Позитивные по маркеру CD117 тучные клетки (стрелки) без признаков дегрануляции в перибронхиальной области нижних дыхательных путей мыши. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против CD117 мыши с докрасиванием азуром II. Увеличение 200×.

лимфоидной ткани приобретают массивный характер, однако не имеют тонкой внутренней структуры, характерной для регионарных лимфатических узлов (рис. 16).

На рис. 17 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, что характерно для их локализации во всех других тканях и органах.

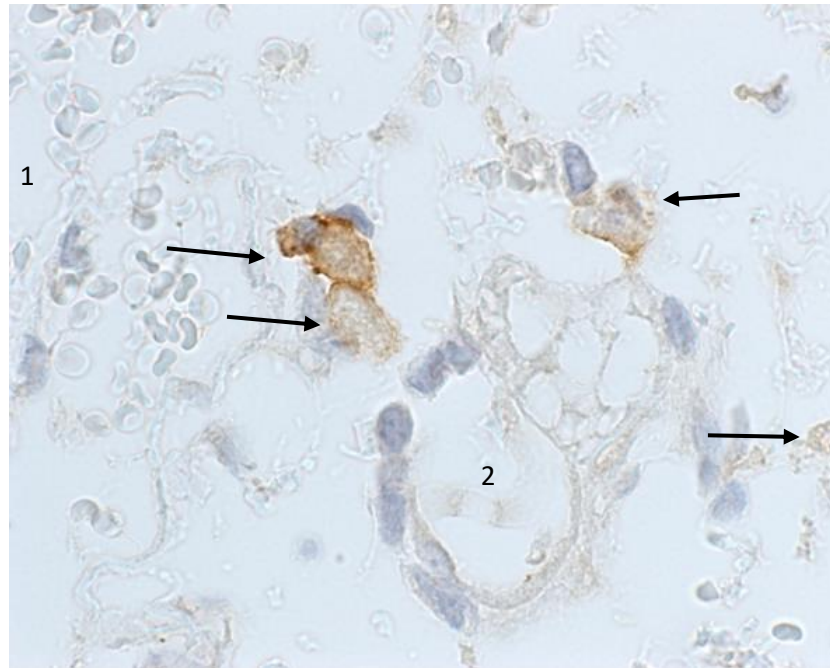


Рис.18. Позитивные по маркеру CD117 тучные клетки (стрелки) на стадии частичной дегрануляции в перибронхиальной области нижних дыхательных путей мыши после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и последующим введением инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против CD117 мыши с докрасиванием азуром II. Увеличение 400×. 1 – просвет бронха; 2 – просвет сосуда.

После иммунизации экспериментальных животных штаммом А/Вьетнам /H5N1 с последующим введением инфекционного штамма А/Индонезия/H5N1 через 8 дней после инфицирования наблюдалось усиление дегрануляции ТК и увеличение их численности в легких. При этом локализация ТК сохранялась, они обнаруживались преимущественно перибронхиально и периваскулярно (рис. 17).

В ходе процесса дегрануляции более четко просматривалась околочелюстная зона тучных клеток, при этом становилось хорошо заметно, что антиген CD117 локализован почти исключительно на плазмалемме тучных клеток, что полностью совпадало с литературными данными (рис. 18). Нередко наблюдали полную дегрануляцию ТК в ответ на введение инфекционного штамма (рис. 19).

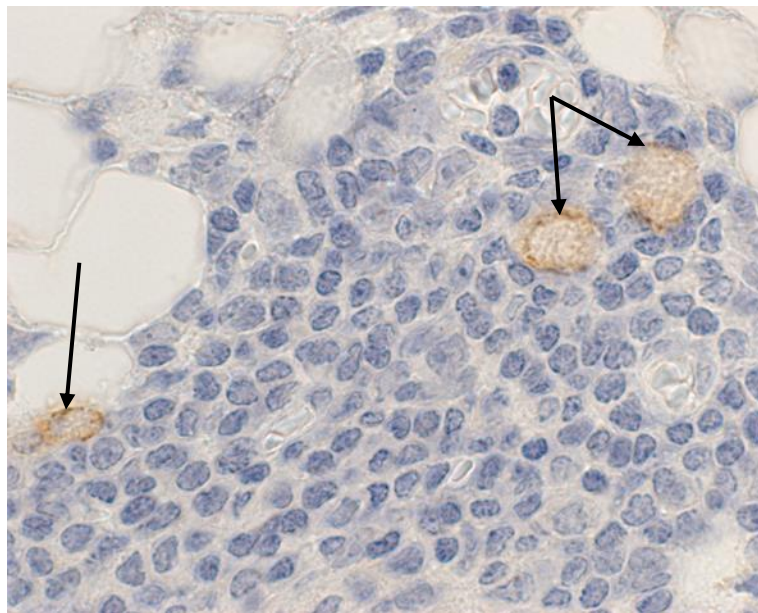


Рис.19. Мембранная локализация антигена CD117 (стрелки) на поверхности дегранулирующих тучных клеток. Перибронхиальная область нижних дыхательных путей мыши после иммунизации штаммом А/Вьетнам/H5N1 и последующим введением инфекционного штамма А/Индонезия/H5N1. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против CD117 мыши с докрасиванием азуром II. Увеличение 1000×.

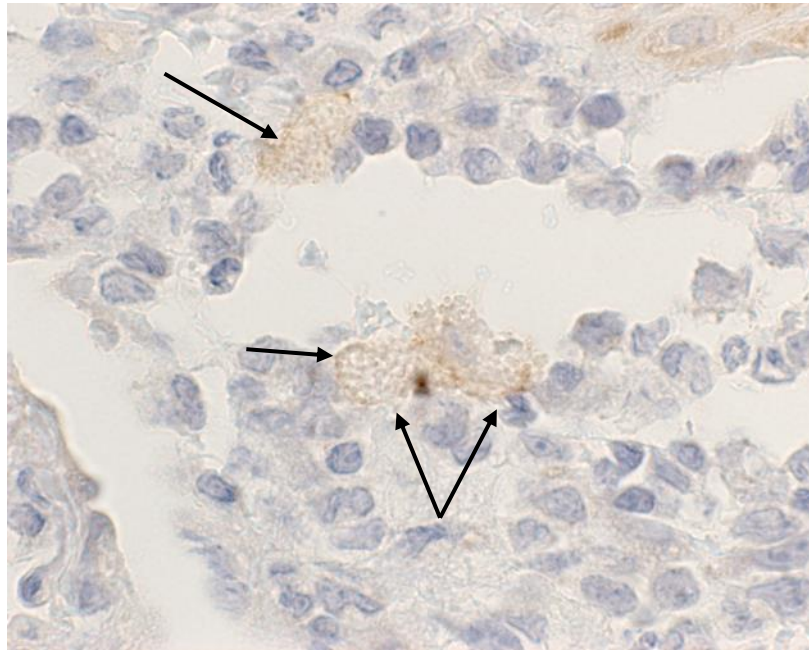


Рис.20. Позитивные по маркеру CD117 тучные клетки (стрелки) на стадии полной дегрануляции в перибронхиальной области нижних дыхательных путей мыши после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и последующим введением инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против CD117 мыши с докрасиванием азуром II. Увеличение 1000×.

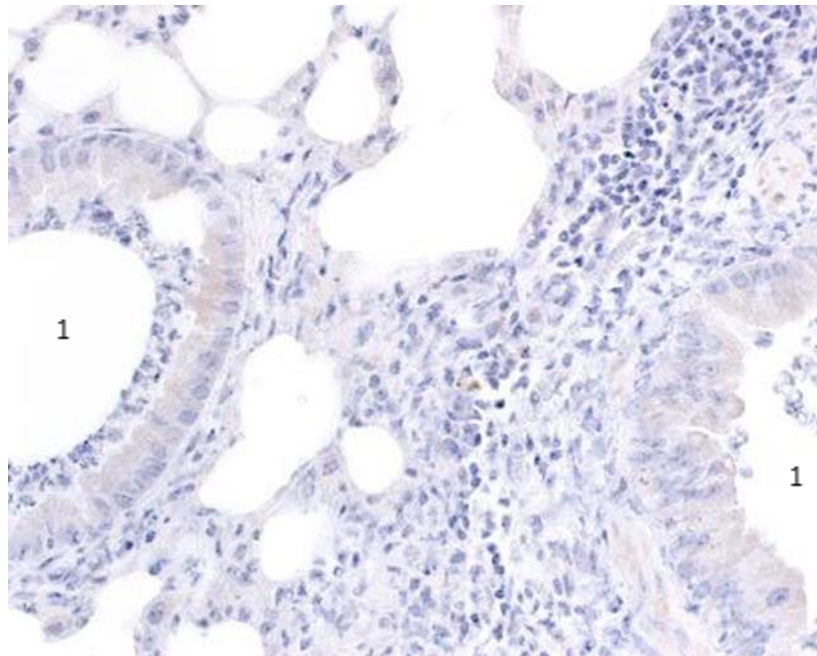


Рис. 21. Повышение плотности лимфоидных скоплений в перибронхиальной области нижних дыхательных путей мыши после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и последующим введением инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1 и запуска дегрануляции тучных клеток. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увеличение 200×. 1 – просвет терминального участка бронха.

После заражения иммунных мышей в поле зрения препаратов в среднем было выявлено от 2 до 10 тучных клеток, все в периваскулярном пространстве; в зонах отека и транссудации эритроцитов из сосудов в поле зрения было обнаружено до 37 дегранулированных тучных клеток (рис. 20).

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. На рис. 21 приведены результаты на 8-й день после введения инфекционного штамма, на рис. 22 – на более поздних сроках.

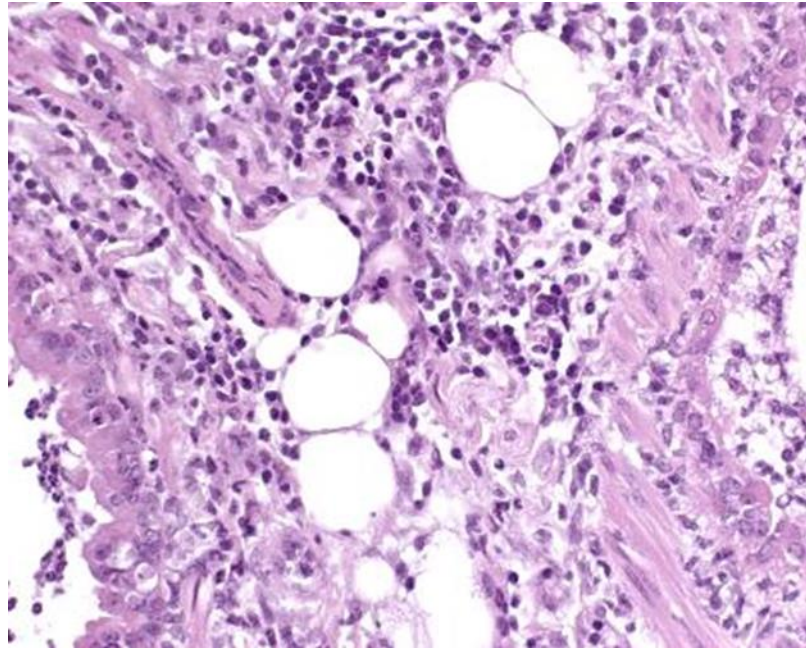


Рис.22. Дальнейшее повышение плотности лимфоидных скоплений в перибронхиальной области нижних дыхательных путей мыши после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и последующим введением инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1 и дегрануляции тучных клеток. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увеличение 200×.

3.4. Патоморфологическое исследование легких при гриппозной инфекции

Гистологическая картина нормальных легких мышей контрольной группы (вне иммунизации и инфицирования) представлена на рис. 23 и 24. В

стенках дыхательных путей выявлена бронхоассоциированная лимфоидная ткань (рис. 24).

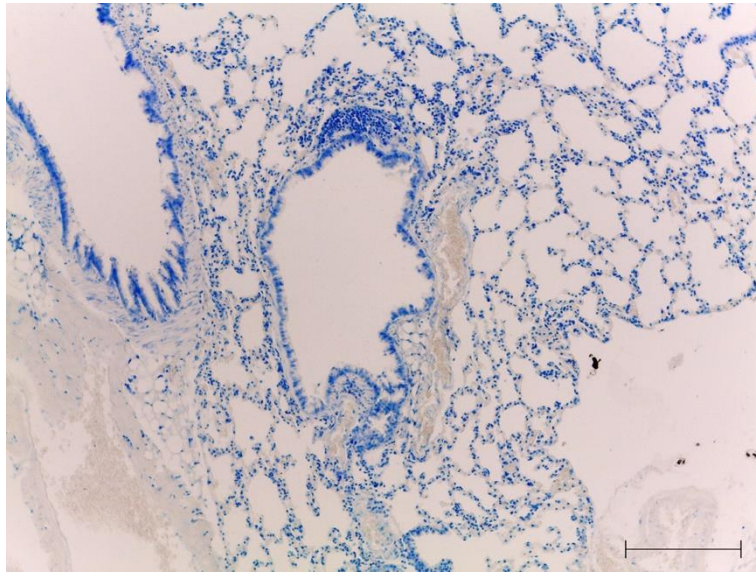


Рис. 23. Гистологическая картина легких контрольных (неиммунизированных) мышей.

Окраска толуидиновым синим – эозином. Объектив 10×. Масштаб 200 мкм.

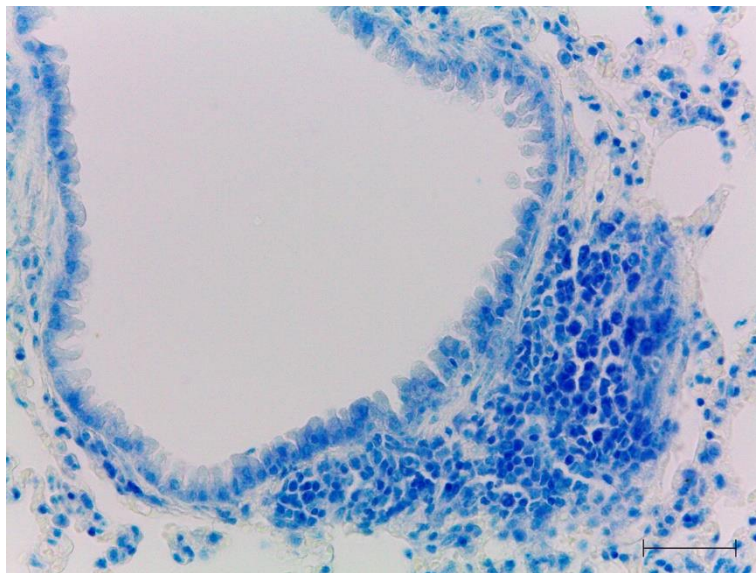


Рис.24. Бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань в легких мышей контрольной группы.

Окраска толуидиновым синим. Объектив 40×. Масштаб 50 мкм.

На рис. 23 видно, что легкие контрольных животных точно соответствуют классической гистологической картине этого органа. Альвеолы легких чистые, недеформированные, правильной формы, без очевидного

содержимого и признаков сдавливания в результате воспаления. Мелкие бронхи в центре и на 10 часах лишены хрящевых элементов в стенке, которая представлена очень тонким слоем гладких мышц. На принадлежность этих структур к мелким бронхам указывает также характер эпителия, выстилающего просвет бронхов: слабо призматический, почти лишенный ресничек и кубический эпителии (полностью лишенный ресничек) характерны именно для мелких бронхов.

Около бронхов просматриваются деформированные, заполненные эритроцитами кровеносные сосуды, что указывает на их принадлежность к венозному руслу. По периферии мелких бронхов можно видеть участки бронх-ассоциированной лимфоидной ткани, которые лучше визуализируются на рис. 24.

На рис.24, помимо участка неинкапсулированной бронх-ассоциированной лимфоидной ткани, можно детально рассмотреть при большем увеличении клетки эпителия, выстилающего полость бронха. Видна призматическая форма клеток, а также слабое развитие или полное отсутствие реснитчатого аппарата на апикальном полюсе клеток. Клетки лимфоидной ткани находятся в неактивном состоянии, не отмечается наличия фигур митозов или других признаков пролиферации.

На рис. 25 и 26 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. Так, на обзорной микрофотографии (рис. 25, малое увеличение) видно, что в просвете бронхов появляется патологический секрет, который является продуктом разрушения и десквамации бронхиального эпителия (рис. 25, 1). В составе этого секрета

хорошо видны остатки ядер погибших и слущенных клеток эпителия. Одновременно появляются разрывы в эпителиальном монослое. В интерстициальной ткани можно наблюдать очаги мононуклеарной инфильтрации (рис. 25, 2). Процесс воспаления распространяется на альвеолы, что приводит к нарушению их структуры (рис. 25, 3) и утолщению межальвеолярных перегородок. Последний процесс хорошо виден на рис. 26. Выявляются обширные участки ателектаза и эмфиземы, обширные мононуклеарные инфильтраты в стенках дыхательных путей и кровеносных сосудов, массивная интерстициальная инфильтрация с утолщением межальвеолярных перегородок (рис. 26).

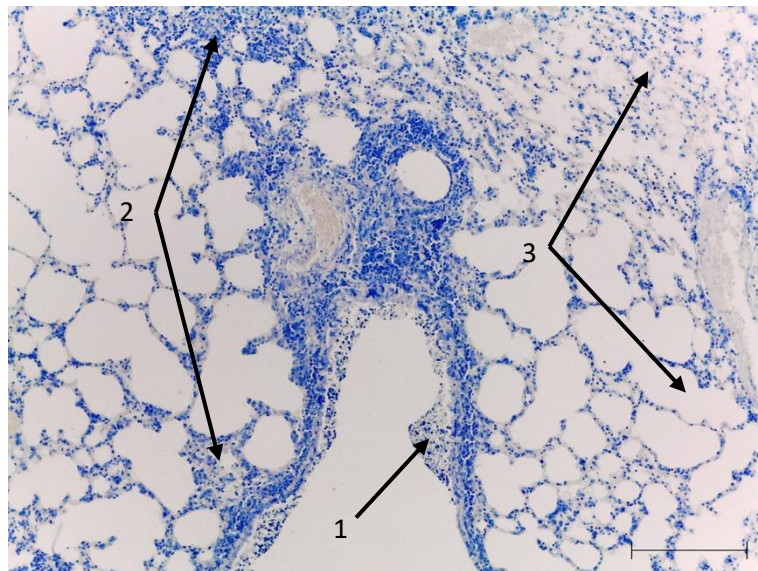


Рис.25. Обзорная гистологическая картина легких мышей, не иммунизированных штаммом А/Нью Йорк/Н1N1рdm09 и инфицированных штаммом А/Южная Африка/Н1N1рdm09, на 8 день после инфицирования. Окрашивание альциановым синим-эозином, объектив 10×, масштаб 200 мкм. 1 – секрет в просвете бронха, 2 – инфильтраты мононуклеарных клеток, 3 – деструктивные изменения альвеол.

После иммунизации животных штаммом А/Нью Йорк/Н1N1рdm09 гистологическая картина легких после введения инфекционного штамма А/Южная Африка/Н1N1рdm09 существенно менялась (рис. 27- 30). На рис. 27

представлен общий вид (малое увеличение) ткани легких на 8-й день после введения инфекционного штамма.

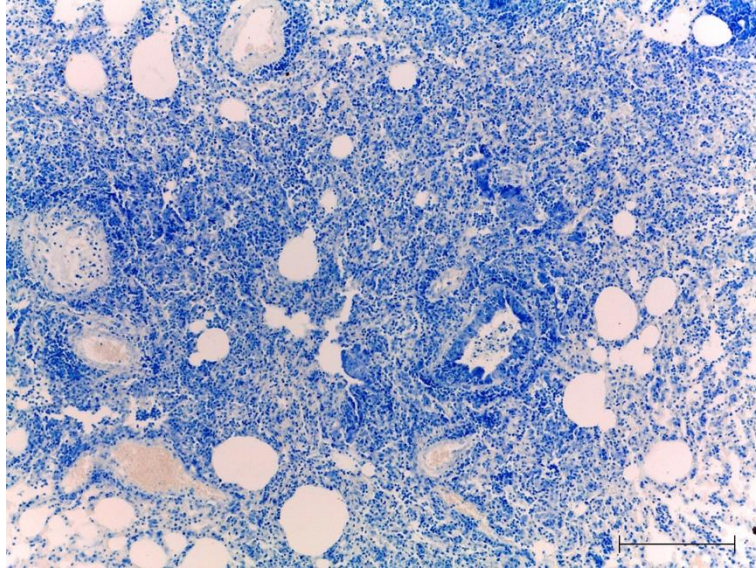


Рис.26. Детальная гистологическая картина легких мышей, не иммунизированных штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 и инфицированных штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09, на 8 день после инфицирования. Окрашивание альциановым синим-эозином, объектив 40×, масштаб 50 мкм.

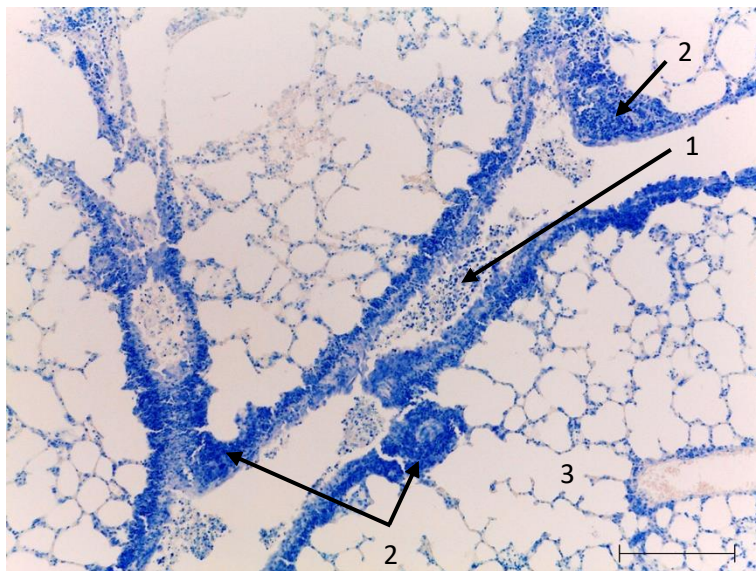


Рис. 27. Обзорная гистологическая картина легких мышей, иммунизированных штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 и инфицированных штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09, на 8 день после инфицирования. Окрашивание альциановым синим-эозином, объектив 10×, масштаб 200 мкм. 1 – секрет в просвете бронха, 2 – инфильтраты мононуклеарных клеток, 3 – деструктивные изменения альвеол.

После инфицирования вирусом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 животных, предиммунизированных А/Нью Йорк/Н1N1pdm09, обширные мононуклеарные инфильтраты присутствуют в стенках дыхательных путей (в частности, по всей их длине) и вокруг кровеносных сосудов (рис. 27, 2). Выявлены дистрофические изменения мерцательного эпителия и десквамация эпителиальных клеток в бронхах, а также умеренные изменения структуры альвеол (рис. 27, 1; рис.28). Выявлены некоторые признаки диффузного альвеолярного поражения, включая интерстициальную инфильтрацию с утолщением межальвеолярных перегородок и эмфизему (рис. 27, 3).

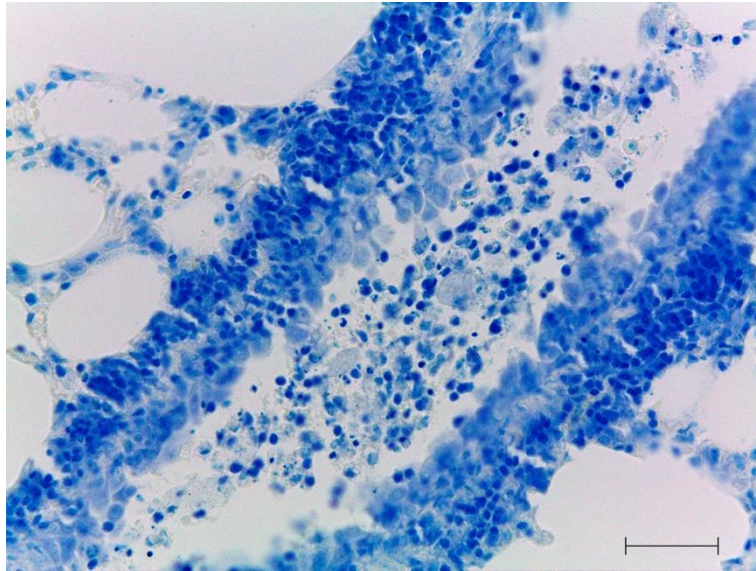


Рис.28. Дистрофические изменения мерцательного эпителия и десквамация эпителиальных клеток в бронхах после иммунизирования штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 и инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09, на 8 день после инфицирования.

Окрашивание толуидиновым синим, объектив 40×, масштаб 50 мкм.

Нельзя не отметить, что в целом после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 изменения в легких после инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 носят гораздо менее выраженный характер, чем в контрольной группе (рис. 29, 30). Мононуклеарная инфильтрация в целом носит гораздо более компактный, а не разлитой характер, при

преимущественно перибронхиальной локализации и лишь местами распространяется на интерстициальную межальвеолярную ткань (рис.29).

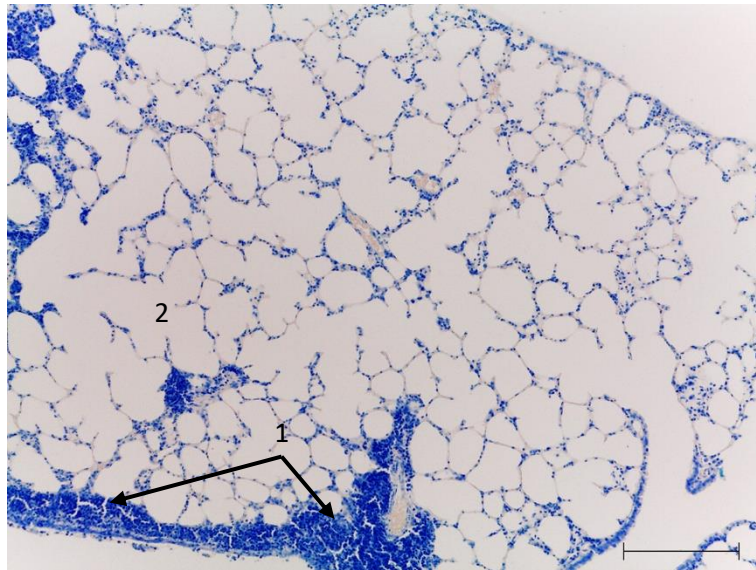


Рис. 29. Локальный характер мононуклеарной инфильтрации в легких мышей после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 и инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09, на 8 день после инфицирования. Окрашивание толуидиновым синим-эозином, объектив 10×, масштаб 200 мкм. 1– инфильтраты мононуклеарных клеток, 2 – деструктивные эмфиземные изменения альвеол.

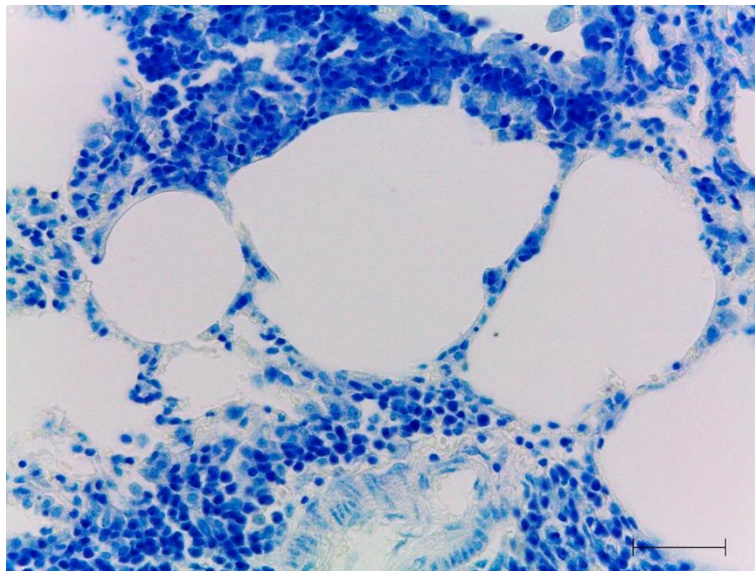


Рис. 30. Мононуклеарная инфильтрации в межальвеолярном пространстве легких мышей после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 и инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09, на 8 день после инфицирования.

Окрашивание толуидиновым синим, объектив 40×, масштаб 50 мкм.

Существенно, что в ответ на введение вируса как без предварительной иммунизации вакцинным штаммом (рис. 25, 26), так и после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 (рис. 27-30) в поле зрения препарата не выявляются заполненные гранулами тучные клетки. Приведенные выше результаты для другой пары вакцинного и инфекционного штаммов вируса гриппа (А/Вьетнам/Н5N1 и А/Индонезия/Н5N1), рис. 17-19) косвенно подтверждают массивную дегрануляцию тучных клеток после формирования протективных IgG- антител в результате иммунизации и после инфицирования другим штаммом вируса того же серотипа. Отсутствие заполненных гранулами тучных клеток на препаратах значимо с той точки зрения, что краситель альциановый синий является одним из специфических гистологических красителей, окрашивающих метахроматические гранулы тучных клеток, а результаты для пары вирусов штамма А/Н5N1 получены на том же сроке 8 суток, что и для штамма А/Н1N1pdm09.

3.5. Влияние блокаторов гистаминовых рецепторов на течение гриппозной инфекции

Для оценки роли гистамина в развитии гриппозной инфекции части животных вводили антигистаминные препараты. В качестве препаратов такого действия использовали комбинацию двух антигистаминных препаратов – гидрохлорида хлоропирамина (препарат «Супрастин», Egis, Венгрия, блокатор Н1-гистаминовых рецепторов) и фамотидина (препарат «Квамател», Gedeon Richter, Венгрия, блокатор Н2-гистаминовых рецепторов). Препараты в составе смеси имели концентрации 10/мг/мл и 2 мг/мл, соответственно). Животные получали по 0,1 мл этой смеси внутрибрюшинно, по 6,7 мг/кг веса тела каждый, в общем объеме 100 мкл. Таким образом, каждое животное получало однократно 1 мг хлоропирамина и 0,2 мг фамотидина на 14-й день после иммунизации, одновременно с введением инфекционного штамма вируса гриппа.

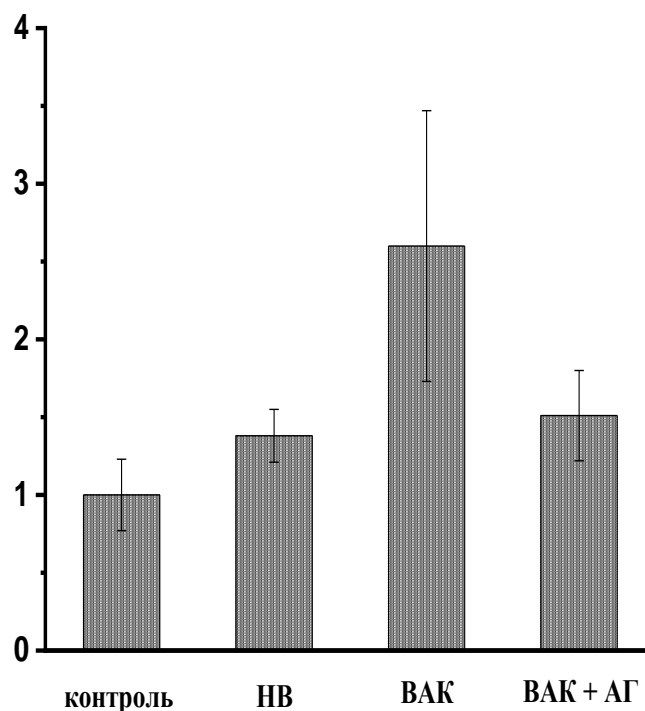


Рис. 31. Уровень гистамина в сыворотке крови мышей разных групп на 8-й день после инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1 после ведения комбинации антигистаминных препаратов.

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; ВАК + АГ - мыши, иммунизированные штаммом А/Вьетнам/Н5N1 за 14 дней до инфицирования и получившие комбинацию антигистаминных препаратов одновременно с инфицированием. По оси ординат: концентрация гистамина в сыворотке крови по результатам ИФА, нг/мл. $M \pm m$, число наблюдений по каждой точке – не менее 4.

На рис. 31 приведены результаты оценки влияния антигистаминных препаратов на уровень гистамина у мышей через 14 дней после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 (иммунизированная вакцинным штаммом группа, ВАК) и на 8-й день после инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1. Эти

результаты в известной степени являются продолжением эксперимента, результаты которого были приведены выше, в разделе 3.3.1.

Приведенные на рис.31 результаты показывают, что введение комбинации блокаторов H1 и H2-рецепторов приводило к снижению уровня гистамина в сыворотке крови инфицированных мышей, хотя как и ранее, все изменения носили характер тенденции и не были статистически достоверными относительно всех приведенных контролей (интактные животные, животные, получившие физраствор и животные, иммунизированные штаммом A/Вьетнам/H5N1. Тем не менее, введение антигистаминных препаратов ожидаемо возвращало сывороточный уровень гистамина к исходному уровню. Введение комбинации супрастина и кваматела сопровождалось уровнем гистамина в сыворотке крови равным $1,51 \pm 0,29$ нг/мл против $1,00 \pm 0,23$ нг/мл у интактных животных после инфицирования, $1,38 \pm 0,17$ нг/мл после введения физраствора перед инфицированием и $2,60 \pm 0,87$ нг/мл после иммунизации перед инфицированием.

Введение комбинации блокаторов антигистаминовых рецепторов не оказывало достоверного влияния и на титр вирусов гриппа штаммов A/Индонезия/H5N1, выделяемого из легких, но достоверно понижало титр вирусов штамма A/H1N1pdm09, выделяемого из легких на 3-и сутки гриппозной инфекции (рис. 32 и 33).

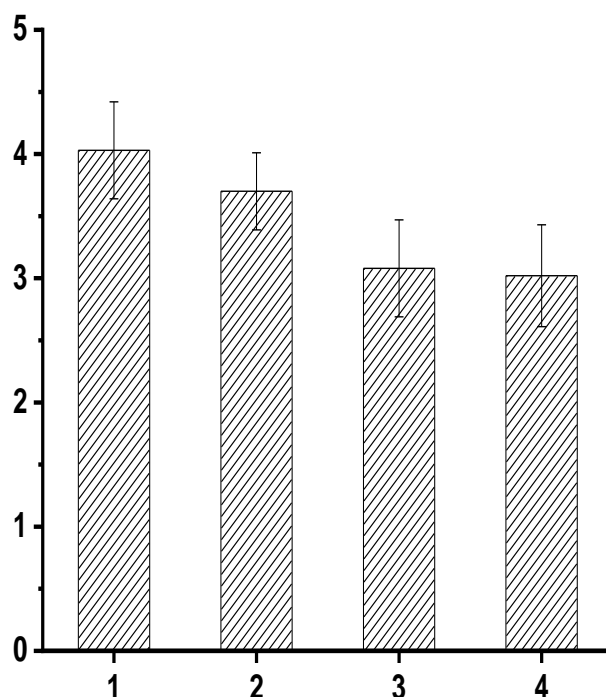


Рис. 32. Содержание вирусов инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1 после иммунизации вакцинными штаммами вируса гриппа на фоне введения блокаторов антигистаминных рецепторов.

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 на фоне введения блокаторов антигистаминных рецепторов. По оси ординат: число вирусных частиц в ткани, $-\lg_{10}$ ЭИД₅₀/мл, $n=5$ по каждой точке.

При попарном сравнении результатов оценки уровней репродукции вируса гриппа штамма А/Индонезия/Н5N1 из легких мышей без предварительной иммунизации (рис. 32, 1 и 2) и после предиммунизации (рис. 32, 3 и 4) видно, что введение комбинации блокаторов гистаминных рецепторов не оказывает влияния на содержание вируса в ткани легких при

гриппозной моноинфекции, не осложненной последующим бактериальным инфицированием.

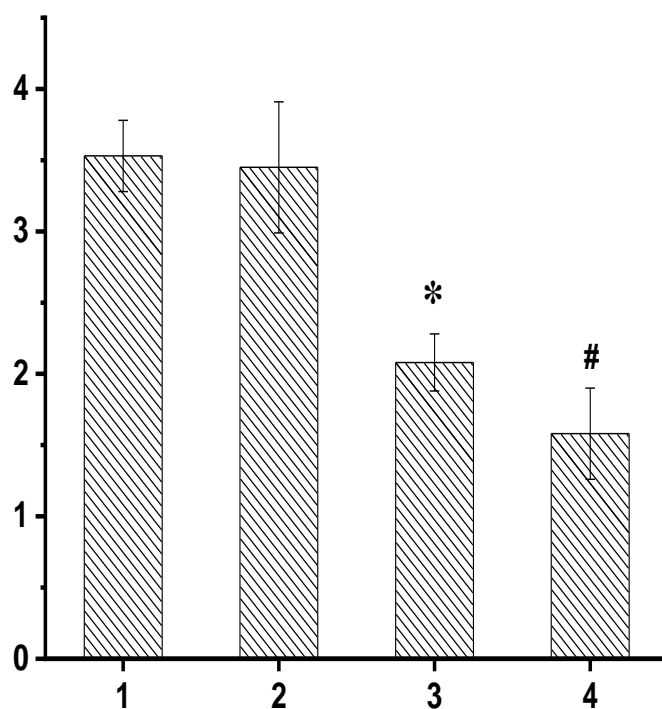


Рис. 33. Содержание вирусов инфекционного штамма А/Южная Африка/Н1N1pdm09 после иммунизации вакцинными штаммами вируса гриппа на фоне введения блокаторов антигистаминных рецепторов.

По оси абсцисс: 1 – контроль, введение ЗФР; 2 – введение ЗФР и блокаторов антигистаминных рецепторов; 3 - предиммунизация штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09; 4 – предиммунизация штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 на фоне введения блокаторов антигистаминных рецепторов. По оси ординат: число вирусных частиц в ткани, $-\lg X$, $n=5$ по каждой точке. * - различия достоверны с контролем (1) при $p<0,05$; # - различия достоверны с контролем (2) при $p<0,05$.

Напротив, для вирусов гриппа штамма Н1N1 выявлено достоверное снижение уровня высевания вируса из ткани легких (рис.33). 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 высеваания вируса инфекционного штамма А/Южная Африка/Н1N1pdm09 из легких ниже на 41% без введения комбинации антигистаминных препаратов (рис. 33, 1 и 3, $p < 0,05$) и на 54% после введения блокаторов гистаминных рецепторов (рис. 33, 2 и 4, $p < 0,05$). При этом антигистаминные препараты сами по себе не обеспечивали снижения уровня высеваемого штамма вируса А/Н1N1pdm09, точно также, как выше это было показано для штамма А/Н5N1 (рис. 32).

При анализе морфологических последствий применения блокаторов Н1- и Н2-рецепторов между штаммами вируса гриппа А/Н5N1 и А/Н1N1pdm09 установлены более выраженные различия (рис. 34–39). На рис. 34 представлен вид totally дегранулирующих тучных клеток мышей после иммунизации 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 totalная дегрануляция тучных клеток с выбросом всех цитоплазматических гранул. Эта картина существенно отличается от результата, представленного на рис. 35, 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.

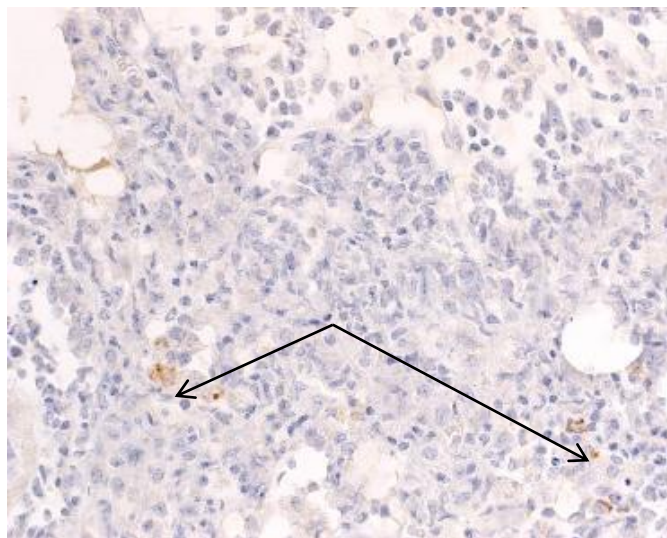


Рис. 34. Иммуногистохимическое окрашивание дегранулирующих тучных клеток мышей после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1 на фоне введения антигистаминных препаратов. Окраска антителами к антигену CD117, докрасивание гематоксилин-эозином. Увеличение 1000×. Стрелки - частично дегранулированные тучные клетки.

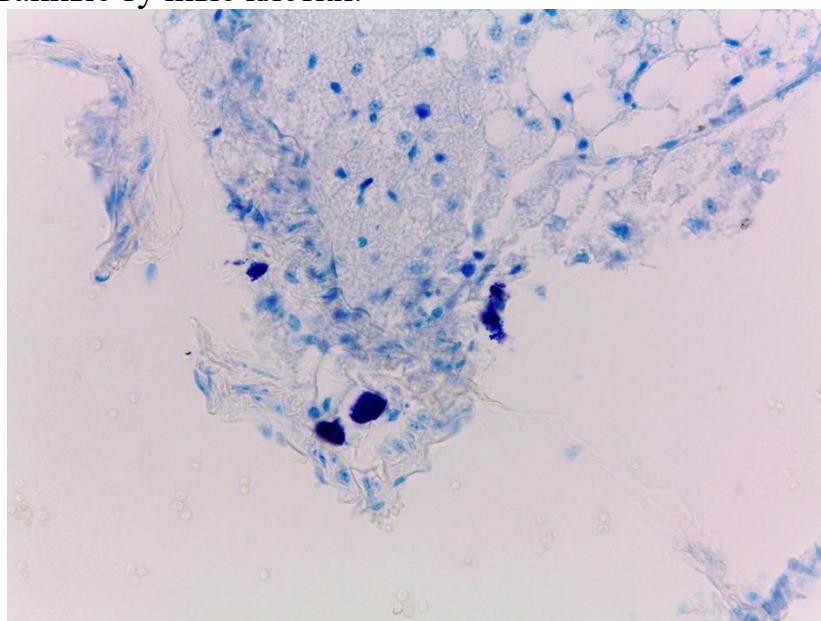


Рис. 35. Тучные клетки без признаков дегрануляции в легких мышей после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09, инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 на фоне введения антигистаминных препаратов. Окрашивание толуидиновым синим. Увеличение 400×.

Введение комбинации антигистаминных препаратов сказывается на размерах и клеточности перибронхиальных лимфоидных скоплений при инфицировании штаммами вируса гриппа А/Н5N1 или А/Н1N1pdm09 (рис. 36

и 37, соответственно). В случае штамма вируса птичьего гриппа введение антигистаминных препаратов не сказывается ни на размерах, ни на клеточности перибронхиальной лимфоидной ткани, когда вся область вокруг бронха была заполнена мононуклеарными клетками (рис. 36). В случае гораздо более распространенного и длительно персистирующего в популяции штамма A/H1N1pdm09 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 (рис. 37).

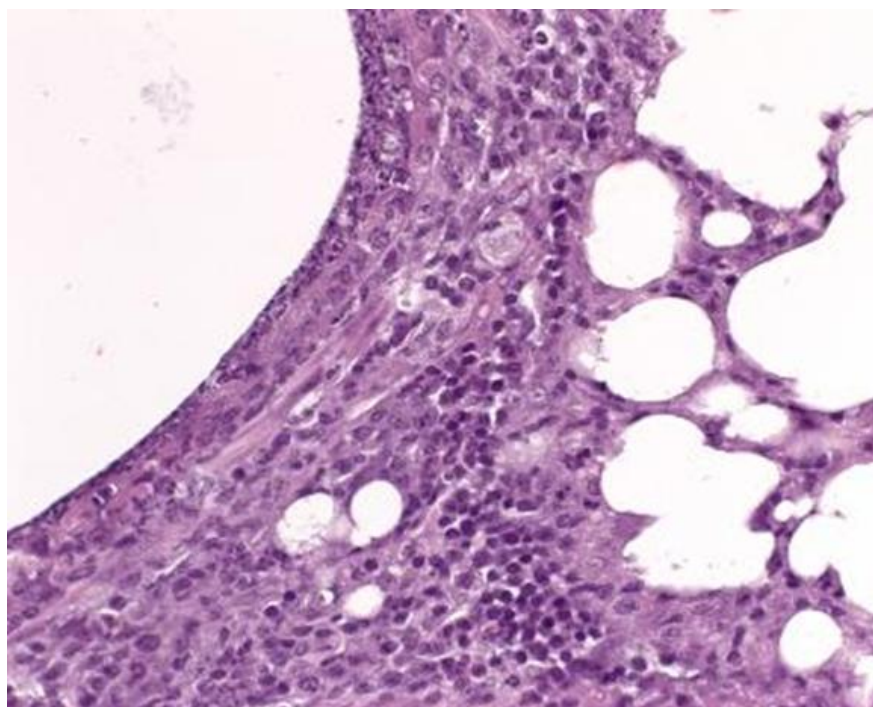


Рис. 36. Обширные участки перибронхиальной лимфоидной ткани в легких мышей после иммунизации штаммом A/Вьетнам/Н5N1 и инфицирования штаммом A/Индонезия/Н5N1 на фоне введения антигистаминных препаратов. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 400×.

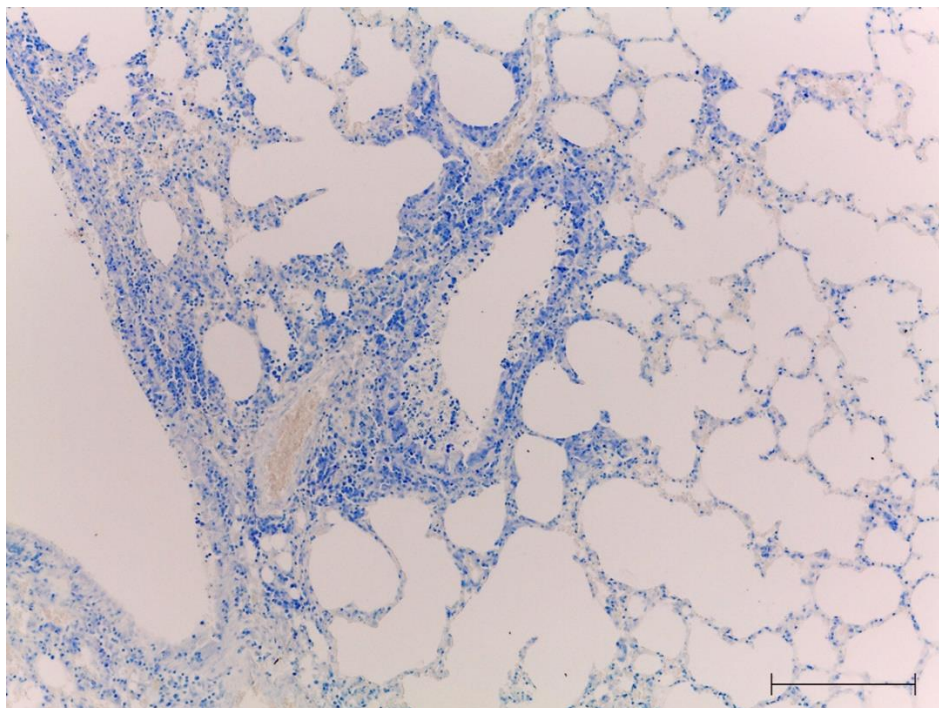


Рис. 37. Перибронхиальная область в легких мышей после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09, инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 на фоне введения антигистаминных препаратов. Окрашивание толуидиновым синим. Увеличение 200×.

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 (рис. 38 и 39). При поствакцинальном введении вируса штамма А/Н5N1 структура альвеол была существенно изменена, отмечался выраженный отек, массивная инфильтрация мононуклеарами и другие признаки развития пневмонии (рис. 38). Напротив, инъекция блокаторов гистаминовых рецепторов в случае поствакцинального инфицирования штаммом А/Н1N1pdm09 обеспечивало формирование принципиально иной картины (рис. 39): хотя определенная инфильтрация межальвеолярного пространства все равно отмечалась, но его ширина была умеренной, а признаки отека не были выраженными.

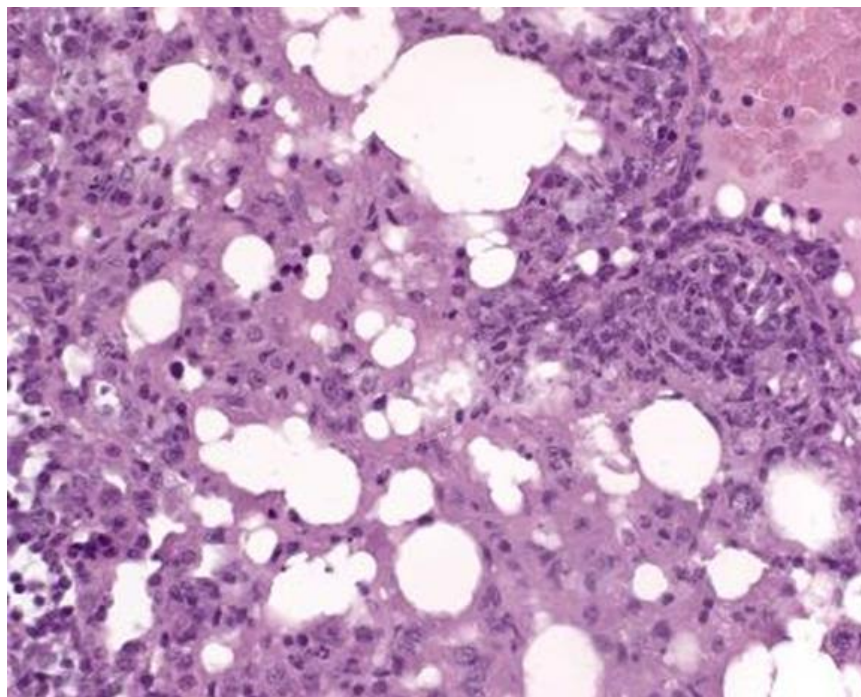


Рис. 38. Измененная структура легочной ткани мышей после иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и инфицирования штаммом А/Индонезия/Н5N1 на фоне введения антигистаминных препаратов. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 400×.

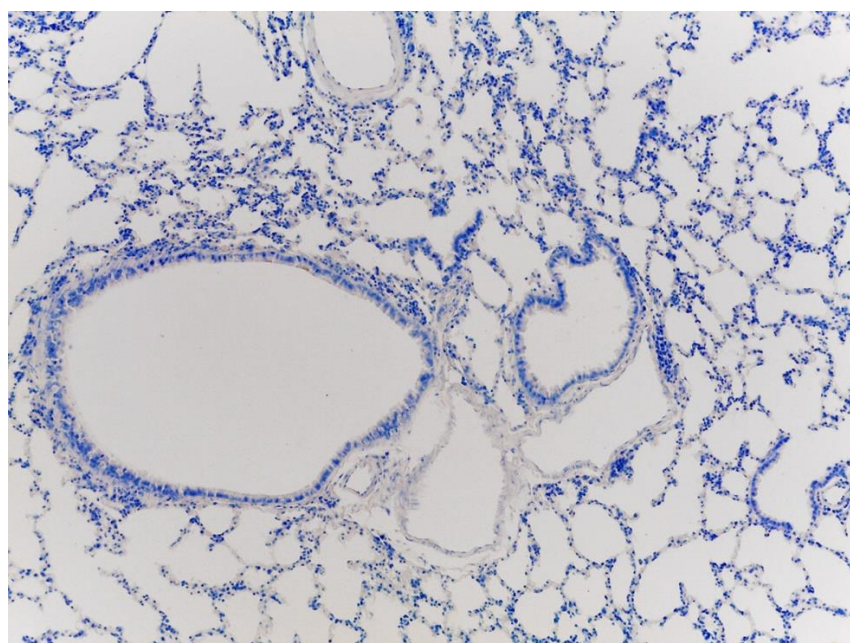


Рис. 39. Минимальные изменения в легочной ткани мышей после иммунизации штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09, инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 на фоне введения антигистаминных препаратов. Окрашивание толуидиновым синим. Увеличение 200×.

На рис. 40-41 приведены результаты оценки влияния иммунизации на показатели массы тела экспериментальных животных, а на рис. 42-43 – на показатели их выживаемости. 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 $TNF\alpha$ – в снижении массы тела. Поэтому динамика показателей массы тела и выживаемости мышей на фоне инфицирования эпидемическими штаммами вируса гриппа будет проанализирована в совокупности.

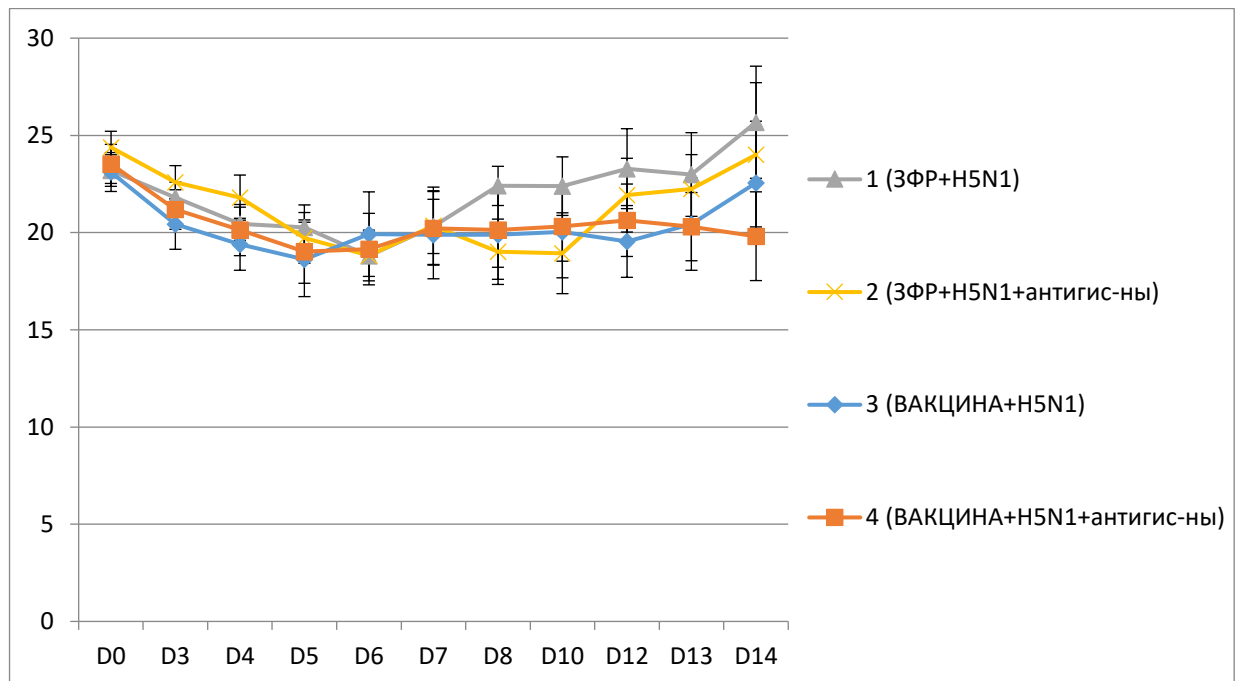


Рис.40. Динамика массы тела мышей, иммунизированных штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и инфицированных штаммом А/Индонезия/Н5N1 на фоне введения антигистаминных (АГ) препаратов.

По оси абсцисс – время эксперимента, сутки, по оси ординат – масса тела мышей, г. $M \pm m$, число наблюдений по каждой точке – не менее 8 к 14-му дню эксперимента. Номера групп и их спецификации приведены в поле рисунка.

Из приведенных на рис. 40 данных видно, что у животных всех экспериментальных групп минимальные показатели массы тела наблюдаются

на 6-7 день после введения штамма птичьего гриппа А/Индонезия/Н5N1, после чего масса тела животных начинала возрастать, хотя и неравномерно по разным группам. В результате к 14-му дню эксперимента самая большая масса тела, которая, возможно, отражает наименьшую продукцию $TNF\alpha$, была отмечена в группе 1 у животных, получивших физраствор вместо вакцинного штамма и инфицированных штаммом птичьего гриппа А/Индонезия/Н5N1, но не получивших антигистаминных препаратов. Напротив, у животных группы 4, иммунизированных штаммом А/Вьетнам/Н5N1, инфицированных через 14 сут штаммом А/Индонезия/Н5N1 и получивших комбинацию блокаторов гистаминных рецепторов, отмечена достоверно более низкая масса тела ($25,68\pm 2,88$ г против $19,81\pm 2,28$ г, $p<0,05$). При этом введение антигистаминных препаратов достоверно не изменяло массу тела, достоверные различия всегда отсутствуют при попарном сравнении как вакцинированных, так и неиммунизированных животных при введении антигистаминных препаратов или без них (рис.40).

В случае иммунизации и/или инфицирования пандемическим штаммом А/Н1N1pdm09 достоверных различий между группами по динамике массы тела отмечено не было вне зависимости от иммунизации и введения комбинации антигистаминных препаратов (рис. 41). И хотя масса тела животных также несколько снижалась к 6-7 сут после инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09, к 10-11 сут она восстанавливалась во всех группах до исходных значений 20,5-21,5 г. Достоверного влияния антигистаминных препаратов не выявлено.

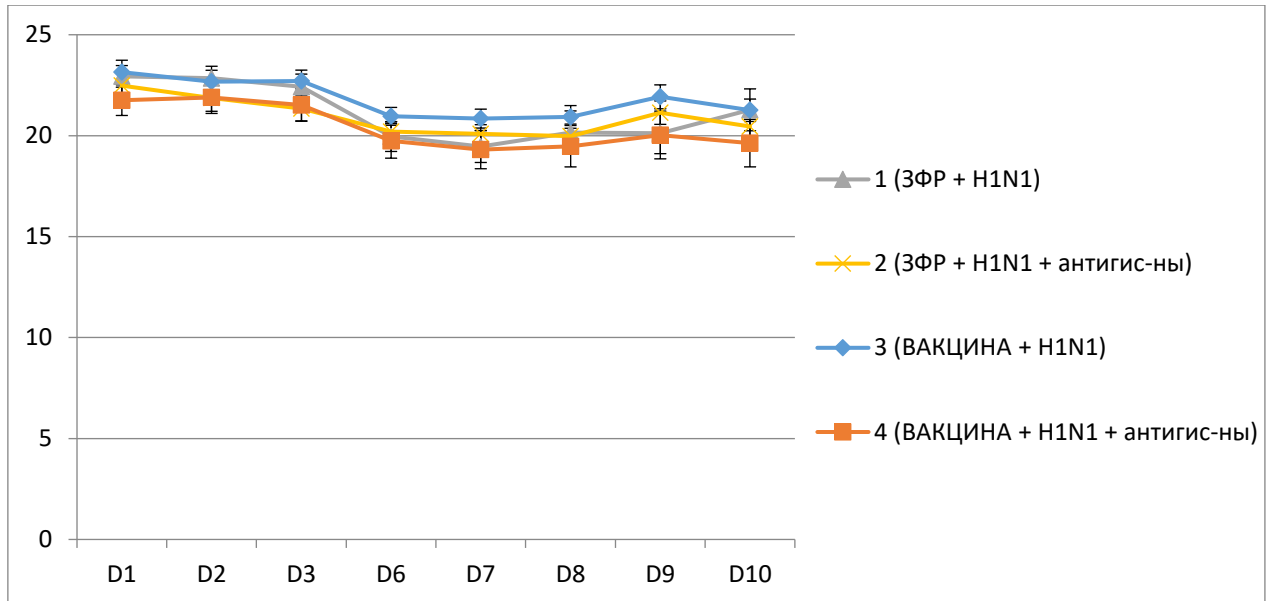


Рис. 41. Динамика массы тела мышей, иммунизированных штаммом А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 и инфицированных штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 на фоне введения антигистаминных (АГ) препаратов.

По оси абсцисс – время эксперимента, сутки, по оси ординат – масса тела мышей, г. $M \pm m$, число наблюдений по каждой точке – не менее 8 к 14-му дню эксперимента. Номера групп и их спецификации приведены в поле рисунка.

Результаты оценки выживаемости в целом полностью совпадают с результатами изменения массы тела мышей: если потенциально пандемический 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 экспериментальных животных (Рис. 42 и 43).

Из графика Каплана-Майера на рис. 42 видно, что потенциально пандемический 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.

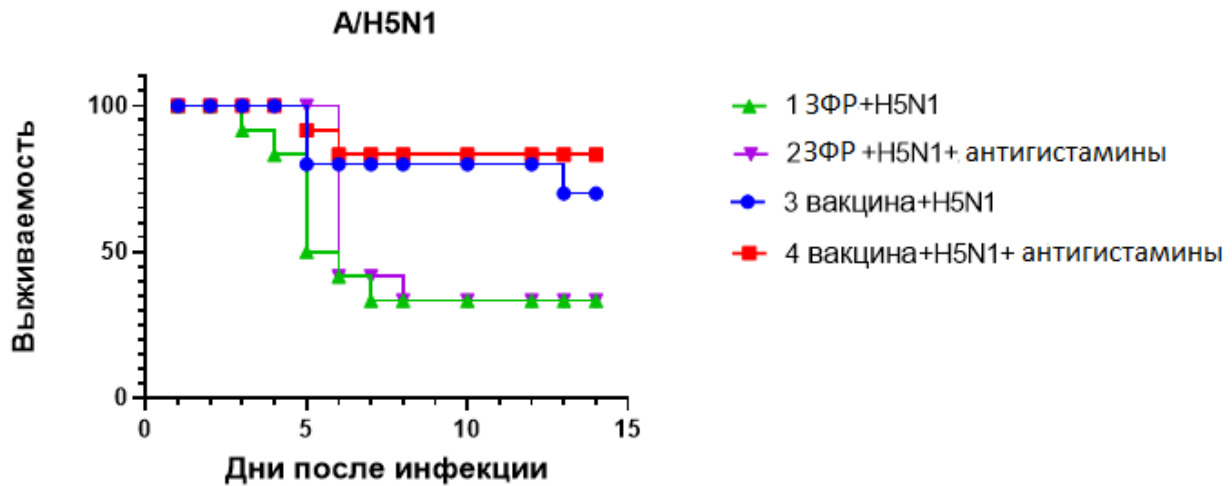


Рис. 42. Кривые Каплана-Майера выживаемости животных разных экспериментальных групп после инфицирования потенциальнопандемическим штаммом A/H5N1. Номера групп и обозначения приведены в поле рисунка.

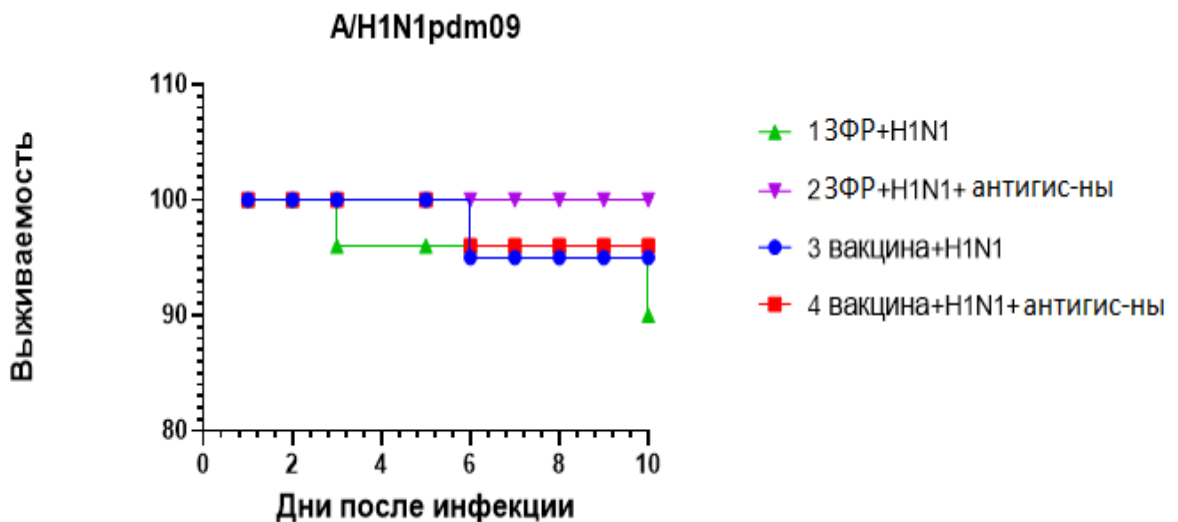


Рис. 43. Кривые Каплана-Майера выживаемости животных разных экспериментальных групп после инфицирования пандемическим штаммом A/H1N1pdm09. Номера групп и обозначения приведены в поле рисунка.

По итогам 12-суточного наблюдения наибольшая летальность (свыше 60%) отмечена в группе 2, которую составили неиммунизированные мыши, получившие блокаторы антигистаминных рецепторов. Немного меньшая, но

все же высокая смертность (около 60%) отмечена в группе 1, животные которой также не были иммунизированы и не получали антигистаминных препаратов. Результаты, приведенные на рис. 42 доказывают, что именно предварительная иммунизация штаммом А/Вьетнам/2004(Н5N1) обеспечивала достоверно более высокую выживаемость животных в ответ на инфекцию потенциально пандемическим штаммом А/Индонезия/Н5N1: если без введения антигистаминных препаратов она составила уже 70% (группа 3), то при введении блокаторов антигистаминных рецепторов она возросла до 83% (рис. 42, группа 4). Этот результат указывает как на высокий протективный эффект иммунизации, так и на существенную роль дегрануляции тучных клеток, вызванной пандемическим штаммом вируса гриппа в патогенезе заболевания и осложнении его течения.

В случае заражающего вируса А/Южная Африка/Н1N1pdm09 наибольшая смертность (10%) была отмечена в группе неиммунизированных животных, не получивших комбинацию антигистаминных препаратов (рис. 43, группа 1). При добавлении антигистаминных препаратов (группа 2) выживаемость животных в ответ на инфицирование штаммом А/Н1N1pdm09 была 100%-ной (рис. 43, группа 2). Иммунизированные штаммом А/Нью Йорк/Н1N1 животные (группы 3 и 4) имели сопоставимые и столь же высокие уровни выживаемости после инфицирования штаммом А/Южная Африка/Н1N1pdm09, которая составила 95% для группы 3 (без введения антигистаминных препаратов) и 96% после их введения (рис. 43).

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сопоставлении полученных результатов и данных литературы можно выделить несколько аспектов, соответствующих планировавшимся задачам по работе.

Во-первых, заслуживают внимания результаты, связанные с оценкой возможности дегрануляции тучных клеток при связывании различных типов Fc γ -рецепторов. Во-вторых, требуют самостоятельного обсуждения данные о влиянии иммунных комплексов, сформированных вирусами гриппа разных штаммов и специфичных к ним IgG на процесс секреции различных гранул ТК. В-третьих, представляется целесообразным анализ физиологических и патофизиологических последствий дегрануляции ТК при экспериментальной гриппозной инфекции и ADE-синдроме, вызванных штаммами A/H5N1 и A/H1N1pdm09, и последствий блокады гистаминовых рецепторов для выживаемости животных и морфологической картины инфекционного процесса в легких.

В настоящем исследовании вирусы A/Вьетнам (H5N1) и A/Нью Йорк/H1N1pdm09 использовались в качестве антигенов для образования иммунных комплексов и их связывания с тучными клетками перитонеального экссудата мышей. Продукция гистамина тучными клетками под действием иммунных комплексов, содержащих вирус гриппа и IgG, носила дозозависимый характер в случае штамма A/H5N1, когда доза вируса 50 ГАЕ была более эффективной по сравнению с 5 ГАЕ.

4.1. Дегрануляция тучных клеток при связывании Fc γ -рецепторов

Феномен дегрануляции ТК при связывании Fc γ -рецепторов был установлен уже в начале 1980-х гг. [36, 72]. Как отмечалось в Главе 1, паттерн Fc γ -рецепторов несколько различается между ТК человека и мыши. Если на ТК человека установлено наличие Fc γ RI (минорно) и Fc γ RIIA, то на циркулирующих базофилах, несмотря на потенциальное родство этих клеток

в гистогенезе на стадии костномозговых предшественников, показано наличие оппозитных по эффектам FcγRIIA и FcγRIIB (в состав цитоплазматического домена FcγRIIA входит мотив ITAM, активирующий метаболизм и функциональную активность ТК, в том числе их дегрануляцию), а в цитоплазматическом домене FcγRIIB человека содержится ITIM-мотив, оказывающий противоположное действие. У мыши наблюдается два существенных отличия от ТК человека: их ТК и циркулирующие базофилы несут одинаковый набор Fcγ-рецепторов, и этот набор включает FcγRIIB (с ITIM-мотивом) и FcγRII (содержащий последовательность ITAM в цитоплазматическом домене) [35, 91, 96].

Ранее на клеточных линиях макрофагов мышей было показано, что антитела против гемагглютинина (HA) или нейраминидазы (NA) вируса гриппа, двух основных структурных компонентов вирусной оболочки, способны индуцировать ADE-синдром [143]. Усиливающая активность зависела от антигенного состава конкретного штамма и была связана с FcR [69, 114, 144]. Изложенные в Главе 3 эксперименты *in vitro* проводились не с очищенной популяцией ТК, а с пулом клеток мышинного перитонеального экссудата, в котором доля ТК составляет около 10% среди клеток других типов (лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов). Однако ТК являются основными клетками, способными к немедленному высвобождению гистамина. Иными словами, в проведенных экспериментах продукция гистамина в ответ на формирование иммунных комплексов, содержащих вирус гриппа и IgG, была связана главным образом именно с тучными клетками.

При этом ранее в литературе приведены данные о возможности дегрануляции ТК под влиянием иммунных комплексов, состоящих из овальбумина и IgG или агрегированного прогреванием при 56°C IgG [45, 97, 148]. Авторы всех этих работ указывают, что эффекты комплексированного

IgG в отношении ТК человека были опосредованы FcγRI рецепторами, которые есть только на ТК человека, в то время как аналогичный эффект в отношении ТК мыши был связан с рецепторами FcγRIIIA [45, 97]. При выполнении данной работы был получен аналогичный результат, который приведен на рис. 11. Обращает на себя внимание, что максимальный эффект агрегированного IgG был связан с наивысшей использованной концентрацией, равной 50 мкг/мл (рис.11), в то время как в цитируемых работах дегрануляция ТК развивалась при 50 мкг/мл, но была максимальной при концентрации по IgG, равной 280 мкг/мл. Следовательно, данные литературы полностью подтверждают обоснованность использованной в работе модели и сам феномен дегрануляции ТК, который развивался в том же диапазоне концентраций IgG, как и в данной работе. Подтверждение феномена дегрануляции ТК под влиянием содержащих IgG иммунных комплексов, описанное в литературе, имеет критическое значение для обоснования последующих результатов и их надежности.

Другим обстоятельством, которое также требовало проверки в рамках исследования, была принадлежность синтезированных после иммунизации или в ходе противоинфекционного ответа антител к классу IgG. Полученные результаты приведены в разделе 3.1. Из приведенных результатов видно, что в ответ на вакцинные штаммы А/Вьетнам/Н5N1 и А/Нью Йорк/2015/Н1N1pdm09 на 8-12 сутки после иммунизации в сыворотке крови мышей достоверно повышается как общий уровень нейтрализующих антител (связанный с комбинацией IgM+IgG), выявляемый в реакции торможения пассивной гемагглютинации (рис. 4 и 7), так и уровень вирус-специфичных антител класса IgG (рис. 5 и 7), выявленных в ИФА. Более того, в ответ на вакцинный штамм А/Вьетнам/Н5N1 и инфекционный штамм А/Индонезия/Н5N1 найдено, что достоверный прирост антител класса IgG начинается с 7-х суток после иммунизации/инфицирования и выходит на плато к 14-м суткам после введения вируса (рис. 6). Важно, что основной

прирост титра противовирусных антител в сыворотке крови связан с IgG-антителами подклассов IgG1 и IgG2a. Этот факт имеет особенно существенное значение, поскольку именно эти подклассы IgG, а также IgG2b, способны к связыванию с рецептором FcγRIII с последующей активацией тучных клеток [28].

Преимущественный синтез IgG в ответ на введение вируса гриппа не является оригинальной находкой, этот результат был многократно показан ранее и полностью совпадает с иммунологической теорией о переключении классов синтезируемых антител с IgM на IgG, начиная с 4-6 суток после иммунизации [23, 56, 163, 173]. Однако обращает на себя внимание другое важное обстоятельство. Если штамм A/H1N1 присутствует в популяции весьма длительное время и многократно был причиной пандемий гриппа, то штамм A/H5N1 появился в популяции относительно недавно. При этом динамика прироста противовирусных IgG антител в случае A/H1N1pdm09 носит более стремительный характер по сравнению с A/H5N1 (рис. 6).

В любом случае, не вызывает сомнений и полностью соответствует клиническим данным тот факт, что предварительное введение вакцинного штамма существенно снижает титр вируса в ткани легких мышей в случае введения инфекционного штамма (рис. 8). При этом в случае штамма H1N1 это снижение носит достоверный характер, а в случае штамма A/H5N1 можно говорить лишь о тенденции к меньшей диссеминации вируса в легочной ткани.

4.2. Дегрануляция тучных клеток в присутствии различных штаммов вируса гриппа

Результаты в Главе 3 содержат новые данные, которые позволяют существенно уточнить патофизиологическое значение дегрануляции ТК при гриппозной инфекции и подтверждают литературные данные о различных механизмах инициации выброса различных гранул ТК. Возможно, эти результаты позволяют существенно уточнить патогенез феномена ADE,

формирование которого возможно при повторном инфицировании, либо после иммунизации.

Основным объектом анализа являются ТК перитонеального экссудата мышей, поскольку клетки линии НМС-1 человека, которые согласно литературе часто являются объектом исследований ТК, несут на своей поверхности далеко не полный репертуар рецепторов. Приведенные в разделе 3.2. данные показывают, что клетки перитонеального экссудата мышей всегда несут на мембране IgE-антитела, связанные с Fcε-рецепторами (рис. 10). Соответственно, внесение антител против IgE мыши вызывает перекрестную сшивку локализованных на мембране комплексов IgE-FcεR, что ведет к выбросу гистамина из ТК перитонеального экссудата без какой-либо предварительной обработки этих клеток образцами нормальных или гипериммунных антисывороток.

Напротив, для фиксации IgG на мембранных FcγRIIIA рецепторах требуется внесение сформированных циркулирующих иммунных комплексов, что само по себе является хорошим указанием на состав молекулярного комплекса (вирус + IgG, а не иной класс иммуноглобулинов), вызывающего дегрануляцию ТК перитонеального экссудата и выброс гистамина. Это доказывают результаты, приведенные в табл. 1. Однако результаты в таблице наводят на мысль о том, что в запуске дегрануляции ТК важно не только наличие комплекса АГ-IgG, но и свойства этого антигена, в нашем случае - серотип вируса гриппа. Так, выброс гистамина в случае вируса H1N1 был гораздо ниже, чем в случае вируса A/H5N1. Принимая во внимание, что антиген-специфичных рецепторов на мембране ТК нет, речь может идти только о прямых эффектах вируса в цитоплазме ТК. Неслучайно формирование комплексов вирус-IgG зачастую рассматривается как механизм доставки вируса в цитоплазму клетки в обход любых интерферон-индуцированных способов противовирусной защиты клетки [73, 74]. Именно такой путь предполагается в случае вируса SARS-CoV2, этиологического

агента COVID-19 [10, 15, 19, 106, 108, 135, 141, 171, 172]. Обладающий в настоящее время умеренной патогенностью вирус А/Нью Йорк/Н1N1pdm09 вызывает примерно в 6 раз меньший выброс гистамина, чем новый и весьма агрессивный штамм А/Н5N1 Vietnam ($1,63 \pm 0,15$ и $9,47 \pm 0,32$, соответственно, при дозе вируса 50 ГАЕ, $p < 0,01$). Этот результат можно объяснить лишь прямыми цитоплазматическими эффектами А/Н5N1. Но все отмеченные выше моменты касаются и формирования ADE-синдрома, поскольку результатом перенесенной ранее инфекции или иммунизации является как раз формирование антител класса IgG, которые могут заметно усиливать транспорт вируса внутрь клетки и его цитопатогенные эффекты.

Результаты в Главе 3 также свидетельствуют в пользу существования разных путей контроля выброса α - и δ -гранул ТК (рис. 12 и 13). Маркером более мелких и плотных, содержащих ферменты и регуляторные белки δ -гранул является триптаза, в то время как гистамин накапливается в более крупных и рыхлых α -гранулах ТК и секретируется вместе с ними. Установлено, что уровень выброса гистамина после введения инфекционного штамма А/Индонезия/Н5N1 прямо зависит от предшествующей антигенной нагрузки и, следовательно, уровня циркулирующих IgG-антител (рис.12): выброс гистамина наименьший из ТК интактных животных без иммунизации и заражения, немного возрастает в случае ложноиммунизированных животных (введение равного объема физиологического раствора вместо вакцинного штамма перед заражением штаммом А/Индонезия/Н5N1 и достигает максимума в случае предиммунизированных и в дальнейшем инфицированных животных. Здесь стоит отметить, что максимальное усиление выброса δ -гранул в группе иммунизированных и зараженных животных, скорее всего, имеет двойственную природу. В группе ложноиммунизированных животных, получивших только заражающий штамм А/Индонезия/Н5N1, проявляется эффект только IgG-антител, сформированных в ответ на заражение к 8-му дню. У предварительно

иммунизированных перед заражением мышей после введения вакцинного вируса к 21-му дню перед заражением, по всей видимости, уже сформировались не только IgG, но и IgE-антитела. Это не только совпадает со сроками формирования IgE-сенсibilизации к любому (в том числе и вирусному) антигену, но и объясняет усиление секреции α -гранул за счет подключения сигнального пути, идущего от Fc ϵ RI-рецепторов.

Напротив, выделение δ -гранул, содержащих триптазу, максимально в случае интактных животных, несколько снижается в случае заражения штаммом А/Индонезия/Н5N1 без предварительной иммунизации штаммом А/Вьетнам/Н5N1 и становится минимальным после иммунизации и заражения штаммом А/Индонезия/Н5N1 (рис.13). Следовательно, сигнал от рецептора Fc γ RIIA (и/или Fc ϵ RI), с которым, по-видимому, была связана дегрануляция тучных клеток перитонеального экссудата, выделение α -гранул и секреция гистамина, напротив, тормозит релизинг δ -гранул, содержащих триптазу.

Этот результат также позволяет ставить вопрос о роли триптазы в ремоделировании матрикса по ходу инфекционного процесса разного генеза. Полученные результаты позволяют предполагать, что по ходу гриппозной инфекции секреция триптазы важна для постинфекционной перестройки матрикса. В других исследованиях было показано, что в случае бактериальной инфекции продукция гистамина и триптазы могут совпадать по времени, и в этом случае триптаза может играть роль патогенетического фактора [67, 101]

При этом, если сопоставлять сигнальные пути от Fc γ - и Fc ϵ -рецепторов, то можно отметить, что промежуточные мессенджеры в этих путях для этих рецепторов не совпадают: если проведение сигнала от Fc ϵ -рецепторов связано с киназами Src и Syk, и через цитозольные посредники приводит к активации протеинкиназы C γ , фосфатидилинозитол-3-киназы и комплекса киназ Ras, Raf, MAPK, то передача сигнала от Fc γ -рецепторов осуществляется при участии Syk, протеинкиназы-C γ , брутоновской тирозинкиназы, опосредована

инозитол-3-фосфатом, диацилглицеролом, Рас-киназой с выходом на Янус-киназы и белок p38 перед передачей сигнала в ядро клетки [148]. При этом для обоих типов рецепторов финальные стадии сигналинга вновь совпадают и включают в себя экспрессию NF-κB, NFAT, AP-1 [129]. Однако расхождение по промежуточным трансмиттерам в сигнальных путях может объяснить, почему подключение Fcγ-пути обеспечивает дополнительный прирост секреторной активности тучных клеток и, наоборот, подключение Fcε-рецепторов также приводит к приросту секреции при ее инициации через Fcγ-рецепторы [128]. Применительно к течению гриппозной инфекции это наблюдение, отраженное на рис. 10 и в табл. 1, вплотную подводит к проявлениям феномена ADE и классических клинических наблюдений, согласно которым в случае заболевания гриппом ранее привитые пациенты переносят инфекцию гораздо тяжелее, чем непривитые.

Однако в ходе работы были выявлены различия между ответной реакцией тучных клеток на штаммы вируса гриппа (разделы 3.1. и 3.2.), что может иметь совершенно иную природу. Ранее было показано, что в ответную реакцию тучных клеток на вирусное инфицирование существенно вовлечены Toll-like рецепторы. Поскольку речь идет о вирусной инфекции с цитоплазматической локализацией антигена, можно уверенно говорить об участии в формировании ответа рецепторов TLR-3, -7, -9, а также цитозольных рецепторов групп NOD и RIG [71]. Показано, что в ответ на гриппозную инфекцию происходит активация механизмов врожденного иммунитета, что связано со связыванием РНК вируса с рецепторами TLR-7, цитозольным распознаванием, опосредованным рецепторами RIG-I и формированием инфламмосомы NLRP3, сборка которой активируется рядом факторов транскрипции и ведет к продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов [156]. Более того, в ответ на инфицирование вирусом гриппа меняется и уровень экспрессии самих молекул TLR, в частности, это показано как раз для TLR-7 при заражении вирусом птичьего гриппа А/Н5N1 [83].

Аналогичное усиление экспрессии TLR при птичьей гриппе было ранее обнаружено и для TLR-3 и -9 [167]. Если во всех цитированных выше работах критерием активации ТК было формирование инфламмосомы, усиление экспрессии генов и продукции провоспалительных цитокинов, то в рамках нашего исследования критерием их активации служила степень дегрануляции ТК и продукции ими гистамина. При этом главный итог работы на уровне клетки и ее секреторной активности полностью совпадает с результатами молекулярно-биологической оценки уровня экспрессии соответствующих генов: высокопатогенный и новый для популяции штамм вируса гриппа А/Н5N1 вызывает гораздо более выраженную активацию ТК и их дегрануляцию по сравнению с давно циркулирующим в популяции вирусом гриппа Н1N1.

4.3. Сопоставление патофизиологических последствий дегрануляции тучных клеток в тканях при инфицировании различными штаммами вируса гриппа

Результаты в разделах 3.3.2. и 3.4., а также частично 3.5. позволяют составить более полную картину патологического процесса при гриппозной инфекции. При этом использование гистохимического и иммуногистохимического методов существенно дополняет результаты иммуноферментного и иммунолюминесцентного анализов и позволяет составить схему патофизиологических изменений, сопровождающих развитие ADE-синдрома.

Результаты, приведенные на рис. 14-17 и 23-24 доказывают, что на момент начала эксперимента животные не имели признаков патологического процесса в бронхах и легких. Гистологическая картина этих препаратов полностью соответствует структуре нормальных бронхов (рис.14, 15, 24), скопления перибронхиальной лимфоидной ткани невелики по площади и имеют умеренную или низкую плотность клеток (рис. 14-16, 24), структура альвеол не изменена (рис. 15, 23). Одновременно немногочисленные тучные

клетки, также локализованные в перибронхиальной соединительной ткани, не имеют признаков дегрануляции и вакуолизации цитоплазмы (рис. 17).

При любом штамме вируса гриппа (как А/Н5N1, так и А/Н1N1pdm09) в ответ на инфицирование гистологическая картина в нижних дыхательных путях меняется, при этом более выраженные изменения связаны с иммунизацией и/или инфицированием штаммом А/Н5N1. На рис. 25-26 представлена патоморфологическая картина бронхов и легких мышей, инфицированных вирусом А/Южная Африка/Н1N1pdm09 без предварительной иммунизации штаммом А/Нью Йорк/2015(Н1N1)pdm09. Хотя изменения не носят критического характера для выживания животного, совокупность этих изменений можно трактовать как развитие пневмонии. Они включают наличие патологического секрета в просвете бронхов, усиление мононуклеарной инфильтрации перибронхиальной лимфоидной ткани, утолщение межальвеолярных перегородок, что неминуемо снижает уровень газообмена.

Предварительная иммунизация снижает уровень деструктивных проявлений, что выражается в меньшем утолщении межальвеолярных перегородок (рис. 29), но не влияет на уровень мононуклеарной инфильтрации и отечность стенок бронхов, сопряженную с уменьшением их диаметра (рис.28). Тем не менее, в случае штамма А/Н1N1pdm09 предварительная иммунизация заметно улучшает клиническую картину и, по-видимому, облегчает течение инфекции. В пользу этого предположения свидетельствуют и результаты оценки выживаемости экспериментальных животных (рис. 43), смертность в которой была гораздо меньшей по сравнению со штаммом А/Н5N1 (рис.42).

В случае вируса А/Н5N1 гистологическая картина очага воспаления не дает убедительных свидетельств эффективности иммунизации (рис. 21-22). В случае инфицирования этим штаммом наблюдается мощная миграция мононуклеаров в перибронхиальную область, сильный отек, выраженное

утолщение межальвеолярного пространства, уменьшение просвета бронхов. В случае инфицирования штаммом A/H5N1 предварительная иммунизация незначительно сказывалась и на выживаемости экспериментальных животных (рис.42).

Важно, что в случае штамма A/H5N1 наблюдается практически сливная дегрануляция тучных клеток с почти полным запусением цитоплазмы и ее вакуолизацией (рис. 19 и 20). Подтверждением связи этих изменений именно с процессом дегрануляции является усиление экспрессии на поверхности клеток маркера CD117, который в неактивированных клетках локализован почти исключительно внутри гранул, а при секреции гранул, в результате слияния их мембраны с плазмалеммой появляется на поверхности тучных клеток (рис. 17-18 и 20) [2].

Выше (раздел 4.2.) указывалось, что дегрануляция тучных клеток может быть связана с формированием IgG-содержащих иммунных комплексов, которые при связывании с FcγRIII рецепторами могут быть важным механизмом активации ТК. Несмотря на то, что выработка IgG после инфицирования A/H5N1 происходит медленнее, чем в случае H1N1 [7, 62, 92], тем не менее, приведенные в Главе 3 результаты и данные литературы указывают, что временного интервала в 23 дня (14 сут после иммунизации и 8 сут после заражения штаммом A/H5N1) достаточно для формирования у мышей как IgG, так и IgE-антител против вируса A/H5N1. Это позволяет ставить вопрос о наличии IgE на поверхности тучных клеток и IgG в циркуляции. После введения инфекционного вируса этого штамма происходит его массивная репликация в клетках эпителия нижних дыхательных путей, что сопровождается отмеченными выше патоморфологическими изменениями.

Массивная инфильтрация перибронхиального пространства мононуклеарами становится следствием продукции эпителиоцитами и лимфоцитами бронх-ассоциированной лимфоидной ткани цитокинов и

хемокинов в ответ на репликацию и диссеминирование вируса [47, 100, 127, 131, 138, 147]. Важным источником цитокинов воспаления и хемокинов могут стать как раз тучные клетки, локализованные в перибронхиальной области, выделяющие эти медиаторы воспаления как при связывании локализованного на мембране IgE через FcεR, так и связывании циркулирующих иммунных комплексов, включающих вирус и IgG, через FcγR. Однако эта схема осложнения течения вирусной инфекции в ответ на штамм A/H5N1 очень точно соответствует одному из вариантов синдрома антителозависимого усиления (ADE-синдром), варианты которого приведены в Главе 1. Дополнительные свидетельства в пользу формирования у животных ADE-синдрома в ответ на иммунизацию и инфицирование штаммом A/H5N1 будут приведены ниже, в ходе обсуждения эффективности блокаторов антигистаминовых рецепторов при гриппозной инфекции.

4.4. Влияние блокаторов гистаминных рецепторов на течение экспериментальной гриппозной инфекции

Для блокирования действия гистамина в экспериментах на мышах мы использовали смесь блокаторов H1 и H2 (хотя основным типом рецепторов на клетках, ответственных за анафилактические эффекты гистамина, являются рецепторы H1). Наши предварительные данные свидетельствуют о том, что гистамин, секретлируемый ТК, вносит существенный негативный вклад в патогенез вирусной инфекции, усугубляя течение инфекционного процесса. Роль гистамина подтверждается снижением летальности животных при введении блокаторов гистаминовых рецепторов.

Тучные клетки принадлежат к системе врожденного иммунитета [114] и экспрессируют рецепторы, характерные для этой системы: рецепторы микробных и вирусных веществ (TLR), факторы комплемента (CR3, CR5) и Fc рецепторы для IgE и IgG. Тучные клетки синтезируют и хранят цитокины в гранулах. Было показано, что ТК продуцируют цитокины IL-1β, IL-6 и TNF-α сильный провоспалительный цитокин [144]. Роль тучных клеток и их Fcε-

рецепторов в механизме реакции гиперчувствительности немедленного типа хорошо известны. Также предполагается, что тучные клетки участвуют в реакциях иммунокомплексного типа (феномен Артюса, и др.), однако роль тучных клеток и их рецепторов Fc для IgG (FcγR) в этих процессах гораздо менее изучена. Тучные клетки также обладают способностью распознавать патогены в отсутствие опсоинов через толл-подобные рецепторы (TLR) или рецептор маннозы (CD48) [69]. Предполагается, что тучные клетки, которые реагируют с антигеном через IgG антитела могут участвовать в развитии ADE.

Данные, полученные в нашем исследовании, коррелируют с более ранними исследованиями, в которых был продемонстрирован положительный эффект антигистаминных препаратов на инфекцию А / H5N1 у мышей [158].

Результаты, приведенные в разделе 3.5., позволяют составить определенное представление о роли тучных клеток и секретируемых ими биологически активных молекул в патогенезе гриппозной инфекции. Введение комбинации блокаторов гистаминных H1- и H2-рецепторов не оказывает достоверного влияния на уровень содержания вируса гриппа штамма А/Н5N1, хотя и закладывает тенденцию к его снижению, что следует из данных, приведенных на рис. 32. Но в случае штамма А/Н1N1pdm09 эти результаты в силу достоверности различий становятся доказанным фактом (рис.33). Примечательно, что даже только предиммунизация без введения комбинации блокаторов гистаминных рецепторов также достоверно снижает уровень вируса, высеваемого из легких. Вероятно, не существует единого механизма, объясняющего эти результаты. Маловероятно, что блокаторы гистаминных рецепторов оказывают прямое влияние на процесс репликации вирусных частиц внутри инфицированных клеток. Следовательно, эти блокаторы ограничивают процесс передачи вируса между клетками, тем самым тормозя его размножение, что выражается в снижении титров высеваемого из ткани легких вируса. Этот механизм представляется более вероятным, поскольку блокаторы обладают противовоспалительным

эффектом [31, 84], а процесс воспаления любой природы (аллергической или инфекционной) всегда облегчает транспорт вируса от клетки к клетке и их последующее инфицирование [131] за счет изменения состава плазмалеммы любых клеток (в том числе и эпителиоцитов) по ходу воспаления [151, 157]. Следует заметить, что противовоспалительные эффекты антигистаминных блокаторов достоверны в случае штамма H1N1, но не купируются этими препаратами в случае штамма A/H5N1. По-видимому, здесь имеет место очередное проявление феномена, который предполагался выше – при ответе на штамм A/H5N1 происходит связывание большего числа внутрицитоплазматических TLR-рецепторов, запуск сигнальных каскадов и активация инфламмосомы, чем в ответ на вирус H1N1. При этом уровень продукции цитокинов воспаления в ответ на A/H5N1 должен быть очень высоким и опасным для организма, что подтверждается как модельными экспериментами, так и клиническими наблюдениями [21, 38, 117, 149]. На фоне продукции высоких концентраций цитокинов воспаления вклад секретлируемого тучными клетками гистамина в дальнейшее обострение воспаления оказывается незначительным, что и проявляется в недостоверном, но направленном характере противовоспалительного (и противовирусного) действия хлоропирамина и фамотидина.

Что касается достоверного понижения уровня вируса в ткани легких после иммунизации (рис.33) в случае вируса штамма A/H1N1pdm09, то механизм развития этого феномена не требует дополнительных комментариев. По-видимому, сформировавшиеся в сыворотке крови противовирусные антитела класса IgG эффективно связываются с молекулами гемагглютинина и нейраминидазы этого штамма, ингибируют их активность и тем самым снижают диссеминацию вируса в ткани легких.

Результаты оценки влияния хлоропирамина и фамотидина на уровень гистамина в сыворотке крови в ответ на инфицирование штаммами A/H5N1 (рис. 31) полностью соответствуют гипотезе, описанной выше и

подтверждают ее. При этом уровень гистамина играет неглавную роль. Он лишь отражает более общие моменты в ходе вирус-индуцированного воспаления.

В целом, можно заключить, что уровень гистамина под действием антигистаминных препаратов в сыворотке после инфицирования вирусом A/H5N1 имел тенденцию к снижению, как и уровень вируса, высеваемого из лёгких. В случае вируса H1N1 те и другие изменения носят достоверный характер и указывают на целесообразность введения антигистаминных препаратов в схему терапии при инфицировании этим штаммом.

Блокаторы гистаминовых рецепторов существенно меняют патоморфологическую картину процесса (рис. 34-39). При этом, если в случае инфицирования штаммом A/H5N1 введение антигистаминных препаратов экспериментальным животным существенно улучшает морфологическую картину в очаге поражения в легких и перибронхиальной области, то в случае инфицирования штаммом A/H1N1pdm09 можно говорить о почти полной нормализации гистологической картины процесса. Так, после введения штамма A/H5N1 можно говорить о продолжении процесса дегрануляции тучных клеток (рис. 34), который не купируется хлоропирамином и фамотидином, при некотором снижении уровня клеточной инфильтрации перибронхиальной области (рис. 36). В введении тех же препаратов на фоне инфицирования животных штаммом H1N1 дегрануляция тучных клеток практически прекращается, и все гранулы с набором провоспалительных факторов остаются внутри тучных клеток (рис.35). Это неминуемо приводит к заметному уменьшению площади и клеточности перибронхиальной лимфоидной ткани за счет торможения миграции мононуклеаров, что должно рассматриваться как признак снижения остроты воспаления.

Однако еще более выраженные отличия в эффектах антигистаминных препаратов при инфицировании разными штаммами вируса гриппа можно наблюдать в самой легочной ткани: в случае штамма H1N1, несмотря на

сохранение слабой мононуклеарной инфильтрации, признаки отека и воспаления почти отсутствуют, а ширина аэрогемального барьера близка к норме (рис. 39). Можно предполагать, что отсутствие отека и воспаления в этой области сопровождается достаточно высоким уровнем газообмена и практически нормальной сатурацией крови кислородом. Но этого нельзя сказать об эффективности препаратов в случае штамма А/Н5N1 (рис. 38), когда несмотря на введение антигистаминных препаратов, сохраняются все признаки пневмонии в виде измененной структуры альвеол, выраженного отека, массивной инфильтрации мононуклеарами. Сохранение таких выраженных морфологических изменений однозначно свидетельствует о низкой сатурации крови и высоком риске летального исхода.

Полученные гистологические результаты ещё раз указывают на существенную роль различий между разными штаммами в характере течения инфекционного процесса и роли тучных клеток в его развитии. Если в случае штамма Н1N1 введение антигистаминных препаратов в схему поддерживающей фармакотерапии обосновано и эффективно, то в случае штамма А/Н5N1 антигистамины оказываются в целом мало эффективными. С одной стороны, полученные результаты подтверждают обоснованность внесения антигистаминных препаратов в противогриппозную композицию "Антигриппин", которая широко использовалась в СССР в 1960-90-х гг., в которой в качестве антигистаминной субстанции использовался дифенгидрамин (препарат "Димедрол"). С другой стороны, в случае появления новых, нетипичных штаммов наличие антигистаминного компонента оказывается не столь эффективным. Это еще раз указывает на обоснованность выдвинутого выше предположения о неодинаковых внутриклеточных эффектах разных штаммов вируса гриппа, в том числе опосредованных внутриклеточными TLR и цитоплазматическими NOD-подобными и RIG-рецепторами.

Выявленные в ходе работы патофизиологические и патоморфологические последствия инфицирования животных штаммами вируса гриппа А/Н5N1 и А/Н1N1pdm09 не могли не сказаться на выживаемости по группам. При этом данные по изменению массы тела (рис. 40, 41) также дают определенную, хотя и косвенную информацию, поскольку одним из важнейших цитокинов, оказывающих доказанное влияние как на массу тела, так и на выживаемость, является TNF- α [5, 6, 33]. Кахектические эффекты TNF- α хорошо известны из литературы с самого начала изучения этого цитокина, равно как и его роль в повышении проницаемости сосудов, формировании отека и активации фагоцитов и других лейкоцитов крови, которые при высоких концентрациях цитокина являются этапами развития летального септического шока [8]. Более того, финальной целью MyD88-зависимых и независимых сигнальных путей, начинающихся от рецепторов TLR при вирусной инфекции, является как процессинг преформированных цитокинов в инфламмосоме с последующей секрецией зрелых форм цитокинов и дальнейшее нарастание каскада воспаления. Хотя в рамках работы оценка концентраций TNF- α не была измерена, весь массив данных, начиная от признаков активации тучных клеток и до патоморфологических свидетельств развития отека, клеточной инфильтрации и гиперсекреции в бронхах (рис.28) указывает на участие TNF- α в инфекционном процессе при гриппе.

Результаты, приведенные на рис.40, указывают, что в группах неиммунизированных мышей после инфицирования штаммом А/Н5N1, сброс массы тела был более выраженным, чем в группах иммунизированных животных. При этом введение антигистаминных препаратов не тормозило липолиза, вызванного вероятной продукцией TNF- α . Введение антигистаминных препаратов не оказывало влияния и у мышей, инфицированных вирусом Н1N1 (рис.41), однако в случае этого штамма изменения массы тела не были достоверными не только в случае добавления

антигистаминных препаратов, но и в случае предшествующей иммунизации. Все это косвенно указывает на более низкий уровень продукции TNF- α после инфицирования штаммом H1N1 по сравнению со штаммом A/H5N1.

Наконец, результаты оценки выживаемости по группам, приведенные на рис. 42 и 43, доказывают, что в любом случае именно предшествующая иммунизация является оптимальным способом защиты от любых штаммов гриппа. Летальность в случае штамма A/H5N1 (рис. 42) резко возростала на 4-6-е сутки после инфицирования, а к концу срока наблюдения окончательно доказывала, что предшествующая иммунизация была эффективна. Однако в случае как иммунизированных, так и неиммунизированных животных, инфицированных штаммом A/H5N1, летальность в группах, получавших антигистаминные препараты, была ниже, чем среди не получавших их.

В случае инфицирования штаммом A/H1N1pdm09 эта закономерность была не столь наглядна в силу низкого общего уровня летальности, однако при попарном сравнении групп, получавших и не получавших антигистаминные препараты, видно, что введение блокаторов гистаминовых рецепторов повышало выживаемость как привитых, так и непривитых животных.

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 аттенуированным штаммом вируса гриппа проводилась 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/Н1N1pdm09. 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 Н1- (хлоропирамин) и Н2-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 штамма А/Н5N1 уменьшает ее на 70%, то добавление комбинации хлоропирамина и фамотидина 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 иммунизации 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 СОКРАЩЕНИЙ

АГ - антигистаминные препараты

в/м – внутримышечно

ГАЕ – гемагглютинирующая единица

и/н – интраназально

ИФА - иммуноферментный анализ

ЗФР – 0,14 М раствор NaCl, забуференный фосфатами, рН7,4

ОРВИ - острые респираторные инфекции

ОФА - ортофталевый альдегид

РГА - реакция гемагглютинации

РТГА - реакция торможения гемагглютинации

ТК - тучная клетка

ЭИД₅₀ - 50% эмбриональная инфекционная доза вируса

ADE – антитело-зависимое усиление

DENV - вирус лихорадки Денге

EV - экстраклеточные везикулы

НА - гемагглютинин

HMC-1- линия мастоцитоподобных клеток человека

IgG – иммуноглобулин G

ITAM - *Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif*, активационная аминокислотная последовательность цитоплазматического участка рецептора

ITIM - *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*, ингибирующая аминокислотная последовательность цитоплазматического участка рецептора

LD₅₀ - 50% летальная доза вируса

НА - нейраминидаза

NETs - нейтрофильные ловушки

NLR - NOD-подобные рецепторы

OD – оптическая плотность

PAF – тромбоцит-активирующий фактор

RDE - рецептор-разрушающий фермент

RSV – респираторно-синцитиальный вирус

RV - риновирусная инфекция

SRSA – медленно реагирующая субстанция анафилаксии

TLR - Toll-подобные рецепторы

Treg -Т-регуляторные клетки

VAERD - ассоциированное с вакциной усиленное респираторное заболевание

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорьев, И.П. Тучные клетки в головном мозге позвоночных. Локализация и функции / И.П. Григорьев, Д.Э. Коржевский // Эволюционная биохимия и физиология. – 2021. – Т.57, №1. – С.17–32.
2. Гусельникова, В.В. Тучные клетки тимуса: на перекрестке трех дорог / В.В. Гусельникова, А.В. Полевщиков // Иммунология. – 2021. – Т.42, №4. – С. 327–336.
3. Дешева, Ю. А. Медицинская вирусология: Учебно-методические рекомендации к практическим занятиям. Санкт - Петербург, 2019.
4. Здор, В.В. Морфофункциональные изменения в железах внутренней секреции и их взаимосвязь с клетками врожденного иммунитета – мастоцитами при экспериментальном тиреотоксикозе / В.В. Здор, Е.В. Маркелова, В.В. Фадеев, Я.Н. Тихонов // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т.21, №4. – С.545-552.
5. Кетлинский, С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. – 552 с.
6. Кетлинский, С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. СПб.: Гиппократ, 1992. – 250 с.
7. Сергеева, М. В. Влияние конформационной стабильности гемагглютиниона вируса гриппа на качество инактивированных вакцин А/Н5N1 / М. В. Сергеева, А. Крохин, М. Матросович, Т. Матросович, М. Волшек, О. И. Киселев, Ю. Р. Романова // Microbiology Independent Research Journal (MIR Journal). – 2014. – Т. 1, №1. – С. 1-11.
8. Симбирцев, А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. – 512 с.
9. Agier, J. The RLR/NLR expression and pro-inflammatory activity of tissue mast cells are regulated by cathelicidin LL-37 and defensin hBD-2 / J. Agier, S. Różalska, M. Wiktorska, P. Żelechowska, J. Pastwińska, E. Brzezińska-Błaszczyk // Sci. Rep. – 2018. – V. 8, №. 1. – P. 11750.

10. Ahmadi, S. Immune evasion of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2); molecular approaches / S. Ahmadi, M. Bazargan, R. Elahi, A. Esmaeilzadeh // *Mol. Immunol.* – 2023. – V. 156. – P. 10-19.
11. Akoto, C. Mast cells are permissive for rhinovirus replication: potential implications for asthma exacerbations / C. Akoto, D. E. Davies, E. J. Swindle // *Clin. Exp. Allergy.* – 2017. – V. 47, №. 3. – P. 351-360.
12. Akula, S. Quantitative In-Depth Analysis of the Mouse Mast Cell Transcriptome Reveals Organ-Specific mast cell heterogeneity / S. Akula, A. Paivandy, Z. Fu, M. Thorpe, G. Pejler, L. Hellman // *Cells.* – 2020. – V. 9, №. 1. – P. 211.
13. Al-Afif, A. Respiratory syncytial virus infection of primary human mast cells induces the selective production of type I interferons, CXCL10, and CCL4 / A. Al-Afif, R. Alyazidi, S. A. Oldford, Y. Y. Huang, C. A. King, N. Marr, I. D. Haidl, R. Anderson, J. S. Marshall // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2015. – V. 136, №. 5. – P. 1346-1354.
14. Aloulou, M. IgG1 and IVIg induce inhibitory ITAM signaling through FcγRIII controlling inflammatory responses / M. Aloulou, S. Ben Mkaddem, M. Biarnes-Pelicot, T. Boussetta, H. Souchet, E. Rossato, M. Benhamou, B. Crestani, Z. Zhu, U. Blank, P. Launay, R. C. Monteiro // *Blood.* – 2012. – V. 119, №. 13. – P. 3084-3096.
15. Aricò, E. Exploiting natural antiviral immunity for the control of pandemics: Lessons from Covid-19 / E. Aricò, L. Bracci, L. Castiello, F. Urbani, J. L. Casanova, F. Belardelli // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2022. – V. 63. – P. 23-33.
16. Baudino, L. Differential contribution of three activating IgG Fc receptors (FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV) to IgG2a- and IgG2b-induced autoimmune hemolytic anemia in mice. / L. Baudino, F. Nimmerjahn, S. Azeredo da

- Silveira, E. Martinez-Soria, T. Saito, M. Carroll, J. V. Ravetch, J. S. Verbeek, S. Izui // *J. Immunol.* – 2008. – V. 180, №. 3. – P. 1948-1953.
17. Belser, J. A. Past, present, and possible future human infection with influenza virus A subtype H7 / J. A. Belser, C. B. Bridges, J. M. Katz, T. M. Tumpey // *Emer. Infect. Dis.* – 2009. – V. 15, №. 6. – P. 859.
18. Bischoff, S. C. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells // *Sem. Immunopathol.* – 2009. – V.31, №2. – P. 185–205.
19. Blanco-Melo, D. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19 / D. Blanco-Melo, B. E Nilsson-Payant, W. C. Liu, S. Uhl, D. Hoagland, R. Møller, T. X. Jordan, K. Oishi, M. Panis, D. Sachs, T. T. Wang, R. E. Schwartz, J. K. Lim, R. A. Albrecht, B. R. tenOever // *Cell.* – 2020. – V. 181, №. 5. – P. 1036-1045.
20. Bodewes, R. Annual influenza vaccination affects the development of heterosubtypic immunity / R. Bodewes, P. L. Fraaij, J. H. Kreijtz, M. M. Geelhoed-Mieras, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, G. F. Rimmelzwaan // *Vaccine.* – 2012. – V. 30, №. 51. – P. 7407-7410.
21. Boon, A. C. A/H5N1 influenza virus pathogenesis in genetically diverse mice is mediated at the level of viral load / A. C. Boon, D. Finkelstein, M. Zheng, G. Liao, J. Allard, K. Klumpp, R. Webster, G. Peltz, R. J. Webby // *mBio.* – 2011. – V. 2, №5. – P.e00171-11.
22. Boonnak, K. Role of Dendritic Cells in Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection / K. Boonnak, B.M. Slike, T.H. Burgess, R.M. Mason, S.J. Wu, P. Sun, M. A. Marovich // *J. Virol.* – 2008. – V. 82, №. 8. – P. 3939-3951.
23. Bote, J. Human Platelets and Influenza Virus: Internalization and Platelet Activation / J. Bote, H. A. Corkrey, M. Koupenova // *Platelets.* – 2022. – V. 33, №. 2. – P. 184-191.

24. Bournazos, S. The role and function of Fc γ receptors on myeloid cells / S. Bournazos, T. T. Wang, J. V. Ravetch // *Microbiol. Spectr.* – 2016. – V.4, № 6. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016.
25. Brauer, R. Influenza virus propagation in embryonated chicken eggs / R. Brauer, P. Chen // *J. Vis. Exp.* – 2015, №. 97. – P. e52421.
26. Brinkmann, V. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs / V. Brinkmann, A. Zychlinsky // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2007. – V.5, №.8. – P. 577-582.
27. Brisse, M. Comparative structure and function analysis of the RIG-I-like receptors: RIG-I and MDA5/ M. Brisse, H. Ly // *Front. Immunol.* – 2019. – V. 10. – P. 1586.
28. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models // *Blood.* —2012. — V.119, № 24. — P. 5640–5649.
29. Bruhns, P. Regulation of allergy by Fc receptors / P. Bruhns, S. Frémont, M. Daéron // *Curr. Opin. Immunol.* – 2005. – V. 17, №. 6. – P. 662-669.
30. Bruns, S. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA / S. Bruns, O. Kniemeyer, M. Hasenberg, V. Aimanianda, S. Nietzsche, A. Thywissen, A. Jeron, J. P. Latgé, A. A. Brakhage, M. Gunzer // *PLoS Pathog.* – 2010 – V. 6, №. 4 – P. e1000873.
31. Buddenkotte, J. Histamine and antihistamines in atopic dermatitis / J. Buddenkotte, M. Maurer, M. Steinhoff // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. V.709. – P. 73-80.
32. Collington S. J. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues / S. J. Collington, T. J. Williams, C. L. Weller // *Trends Immunol.* – 2011 – V. 32, №. 10 – P. 478-485.
33. Cruse, G. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease / G. Cruse, P. Bradding // *Eur. J. Pharmacol.* – 2016. – V. 778. – P. 125-138.

34. da Silva E.Z.M. Mast cell function: a new vision of an old cell / E.Z.M. da Silva, M.C. Jamur, C. Oliver // *J. Histochem. Cytochem.* – 2014. – V. 62, №. 10. – P. 698-738.
35. Daëron, M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future / M. Daëron, S. Jaeger, L. Du Pasquier, E. Vivier // *Immunol. Rev.* – 2008. – V. 224, №. 1. – P. 11-43.
36. Daëron, M. Mast cell membrane antigens and Fc receptors in anaphylaxis. II. Functionally distinct receptors for IgG and for IgE on mouse mast cells / M. Daëron, A. Prouvost-Danon, G. A. Voisin // *Cell. Immunol.* – 1980. – V. 49, №. 1. – P. 178-189.
37. Dawicki, W. New and emerging roles for mast cells in host defence / W. Dawicki, J. S. Marshall // *Curr. Opin. Immunol.* – 2007. – V. 19, №. 1. – P. 31-38.
38. de Jong, M. D. Fatal outcome of human influenza A (A/H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia / M. D. de Jong, C. P. Simmons, T. T. Thanh, V. M. Hien, , G. J. Smith, T. N. Chau, D. M. Hoang, N. V. Chau, T. H. Khanh, V. C. Dong, P. T. Qui, B. V. Cam, doQ. Ha, Y. Guan, J. S. Peiris, N. T. Chinh, T. T. Hien, J. Farrar // *Nat. Med.* – 2006. – V. 12, №. 10. – P. 1203-1207.
39. De Maria, A. Revisited function of human NK cell subsets / A. De Maria, L. Moretta // *Cell Cycle.* – 2011. – V. 10, №. 8. – P. 1178-1179.
40. Desheva, J. A. Characterization of an influenza A H5N2 reassortant as a candidate for live-attenuated and inactivated vaccines against highly pathogenic A/H5N1 viruses with pandemic potential / J. A. Desheva, X. H. Lu, A. R. Rekestin, L. G. Rudenko, D. E. Swayne, N. J. Cox, J. M. Katz, A. I. Klimov // *Vaccine.* – 2006. – V. 24, №. 47-48. – P. 6859-6866.
41. Ding, J. Antigen/IgG immune complex-primed mucosal mast cells mediate antigen-specific activation of co-cultured T cells / J. Ding, Y. Fang, Z. Xiang // *Immunology.* – 2015 – V. 144, №. 3 – P. 387-394.

42. Dudeck, A. Mast cells as protectors of health / A. Dudeck, M. Köberle, O. Goldmann, N. Meyer, J. Dudeck, S. Lemmens, M. Rohde, N. G. Roldán, K. Dietze-Schwonberg, Z. Orinska, E. Medina, S. Hendrix, M. Metz, A. C. Zenclussen, E. von Stebut, T. Biedermann // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2019. – V. 144, №. 4. – P. S4-S18.
43. Erjefält J. S. Mast cells in human airways: the culprit? // *Eur. Resp. Rev.* – 2014. – V. 23, №. 133. – P. 299-307.
44. Escalera-Zamudio, M. Characterization of an influenza A virus in Mexican swine that is related to the A/H1N1/2009 pandemic clade / M. Escalera-Zamudio, G. Cobián-Güemes, M. de los Dolores Soto-del Río, P. Isa, I., Sánchez-Betancourt, A. Parissi-Crivelli, M. T. Martínez-Cázares, P. Romero, L. Velázquez-Salinas, B. Huerta-Lozano, M. Nelson, H. Montero, P. Vinuesa, S. López, C. F. Arias // *Virology.* – 2012. – V. 433, №. 1. – P. 176-182.
45. Fang, Y. Apoptosis of mouse mast cells is reciprocally regulated by the IgG receptors FcγRIIB and FcγRIIIA / Y. Fang, L. Larsson, P. Bruhns, Z. Xiang // *Allergy.* – 2012. – V. 67, №. 10. – P. 1233-1240.
46. Féger, F. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens / F. Féger, S. Varadaradjalou, Z. Gao, S. N. Abraham, M. Arock // *Trends. Immunol.* – 2002. – V. 23, №. 3. – P. 151-158.
47. Ferreira, A. C. Severe influenza infection is associated with inflammatory programmed cell death in infected macrophages / A. C. Ferreira, C. Q. Sacramento, F. S. Pereira-Dutra, N. Fintelman-Rodrigues, P. P. Silva, M. Mattos, C. S. de Freitas, A. Marttorelli, G. R. de Melo, M. M. Campos, I. G. Azevedo-Quintanilha, A. S. Carlos, J. V. Emídio, C. C. Garcia, P. T. Bozza, F. A. Bozza, T. M. L. Souza // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2023. – V. 13. – P. 142.
48. Forsythe, P. Mast cells in neuroimmune interactions // *Trends Neurosci.* – 2019. – V. 42, №. 1. – P. 43-55.

49. Fujita, Y. Intercellular communication by extracellular vesicles and their microRNAs in asthma / Y. Fujita, Y. Yoshioka, S. Ito, J. Araya, K. Kuwano, T. Ochiya // *Clin. Therap.* – 2014. – V. 36, №. 6. – P. 873-881.
50. Furuta, T. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in Dengue shock syndrome / T. Furuta, L. A. Murao, N. T. Lan, N. T. Huy, V. T. Huong, T. T. Thuy, V. D. Tham, C. T. Nga, T. T. Ha, Y. Ohmoto, M. Kikuchi, K. Morita, M. Yasunami, K. Hirayama, N. Watanabe // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2012. – V. 6, №. 2. – P. e1505.
51. Galli, S. J. IgE and mast cells in allergic disease / S. J. Galli, M. Tsai // *Nat. Med.* – 2012 – V. 18, №. 5 – P. 693-704.
52. Galli, S. J. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances / S. J. Galli, J. Kalesnikoff, M. A. Grimbaldston, A. M. Piliponsky, C. M. Williams, M. Tsai // *Annu. Rev. Immunol.* – 2005. – V. 23. – P. 749-786.
53. Graham, A. C. Mast cells and influenza a virus: association with allergic responses and beyond / A. C. Graham, R. M. Temple, J. J. Obar // *Front. Immunol.* – 2015. – V. 6. – P. 238.
54. Graham, B. S. Vaccines against respiratory syncytial virus: The time has finally come // *Vaccine.* – 2016. – V. 34, №. 30. – P. 3535-3541.
55. Guihot, A. Low titers of serum antibodies inhibiting hemagglutination predict fatal fulminant influenza A(H1N1) 2009 infection / A. Guihot, C. E. Luyt, A. Parrot, D. Rousset, J. M. Cavaillon, D. Boutolleau, C. Fitting, P. Pajanirassa, A. Mallet, M. Fartoukh, H. Agut, L. Musset, R. Zoorob, A. Kirilovksy, B. Combadière, S. van der Werf, B. Autran, G. Carcelain, FluBAL Study Group // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* – 2014. – V. 189, №. 10. – P. 1240-1249.
56. Günther, F. Virusassoziierte Arthritiden [Virus-associated arthritis] / F. Günther, M. Fleck, B. Bach // *Zeitschrift für Rheumatologie.* – 2017. – V. 76. – P. 693-704.

57. Gurish, M. F. Mouse Mast Cells that possess segmented / multi-lobular nuclei / M. F. Gurish, D. S. Friend, M. Webster, N. Ghildyal, C. F. Nicodemus, R. L. Stevens // *Blood*. – 1997. – V. 90, №. 1. – P. 382-390.
58. Gustin, K. M. Innovations in modeling influenza virus infections in the laboratory / K. M. Gustin, J. A. Belser, J. M. Katz, T. M. Tumpey, T. R. Maines // *Trends Microbiol.* – 2012. – V. 20, №. 6. – P. 275-281.
59. Halstead S. B. Immunological parameters of togavirus disease syndromes. – New York : Academic Press, 1980. – P. 107-173.
60. Hawkes R. A. Enhancement of the infectivity of arboviruses by specific antisera produced in domestic fowls // *Aust J. Exp Biol Med Sci.* – 1964. – V. 42, №. 4. – P. 465-482.
61. Hawkes, R.A. The enhancement of virus infectivity by antibody / R. A. Hawkes, K. J. Lafferty // *Virology*. – 1967. – V. 33, №. 2. – P. 250-261.
62. Hoffmann, E. Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of A/H5N1 influenza virus vaccines / E. Hoffmann, A. S. Lipatov, R. J. Webby, E. A. Govorkova, R. G. Webster // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – V. 102, №. 36. – P. 12915-12920.
63. Hohdatsu, T. A study on the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline macrophages by monoclonal antibodies / T. Hohdatsu, M. Nakamura, Y. Ishizuka, H. Yamada, H. Koyama // *Arch. Virol.* – 1991. – V. 120, №3-4. – P. 207-217.
64. Hosoda, M. Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils / M. Hosoda, M. Yamaya, T. Suzuki, N. Yamada, M. Kamanaka, K. Sekizawa, J. H. Butterfield, T. Watanabe, H. Nishimura, H. Sasaki // *J. Immunol.* – 2002. – V. 169, №. 3. – P. 1482-1491.
65. Hoth, M. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells / M. Hoth, R. Penner // *Nature*. – 1992. – V. 355, №. 6358. – P. 353-356.

66. Hu, Y. Mast cell-induced lung injury in mice infected with A/H5N1 influenza virus / Y. Hu, Y. Jin, D. Han, G. Zhang, S. Cao, J. Xie, J. Xue, Y. Li, D. Meng, X. Fan, L. Q. Sun, M. Wang // *J. Virol.* – 2012. – V. 86, №. 6. – P. 3347-3356.
67. Huang, C. Evaluation of the substrate specificity of human mast cell tryptase beta I and demonstration of its importance in bacterial infections of the lung / C. Huang, G. T. De Sanctis, P. J. O'Brien, J. P. Mizgerd, D. S. Friend, J. M. Drazen, L. F. Brass, R. L. Stevens // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276, №. 28. – P. 26276-26284.
68. Huber, M. Regulation of the pleiotropic effects of tissue-resident mast cells / M. Huber, A. C. B. Cato, G. K. Ainooson, M. Freichel, V. Tsvilovskyy, R. Jessberger, E. Riedlinger, C. P. Sommerhoff, S. C. Bischoff // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2019. – V. 144, №. 4. – P. S31-S45.
69. Huo, C. Genomic and Bioinformatic Characterization of Mouse Mast Cells (P815) Upon Different Influenza A Virus (H1N1, A/H5N1, and H7N2) infections / C. Huo, H. Wu, J. Xiao, D. Meng, S. Zou, M. Wang, P. Qi, H. Tian, Y. Hu // *Front. Genet.* – 2019. – V. 10. – P. 595.
70. Jang, J. E. Intravenous immunoglobulins modulate neutrophil activation and vascular injury through Fc γ RIII and SHP-1 / J. E. Jang, A. Hidalgo, P. S. Frenette // *Circ. Res.* – 2012. – V. 110, №. 8. – P. 1057-1066.
71. Jiménez, M. Responses of Mast Cells to Pathogens: Beneficial and Detrimental Roles / M. Jiménez, D. Cervantes-García, L. E. Córdova-Dávalos, M. J. Pérez-Rodríguez, C. Gonzalez-Espinosa, E. Salinas // *Front. Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 685865.
72. Jönsson, F. Human Fc γ RIIA induces anaphylactic and allergic reactions / F. Jönsson, D. A. Mancardi, W. Zhao, Y. Kita, B. Iannascoli, H. Khun, P. Bruhns // *Blood.* – 2012. – V. 119, №. 11. – P. 2533-2544.
73. Jönsson, F. Mast cells and company / F. Jönsson, M. Daëron // *Front. Immunol.* – 2012. – V. 3. – P. 16.

74. Junker, F. Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation / F. Junker, J. Gordon, O. Qureshi // *Front. Immunol.* – 2020. – V.11. – P. 1393.
75. Kambayashi, T. Inducible MHC class II expression by mast cells supports effector and regulatory T cell activation / T. Kambayashi E. J. Allenspach J. T. Chang, T. Zou, J. E. Shoag, S. L. Reiner, A. J. Caton, G. A. Koretzky // *J. Immunol.* – 2009. – V. 182. – №. 8. – P. 4686-4695.
76. Kendal, A. P. Concepts and procedures for laboratory-based Influenza surveillance / A. P. Kendal, M. S. Pereira, J. Skehel // *Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance.* – 1982. – P. B17-B35.
77. Khurana, S. Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease / S. Khurana, C. L. Loving, J. Manischewitz, L. R. King, P. C. Gauger, J. Henningson, A. L. Vincent, H. Golding // *Sci. transl. med.* – 2013. – V. 5, №. 200. – P. 200ra114.
78. Kilbourne, E. D. The total influenza vaccine failure of 1947 revisited: major intrasubtypic antigenic change can explain failure of vaccine in a post-World War II epidemic. / E. D. Kilbourne, C. Smith, I. Brett, B. A. Pokorny, B. Johansson, N. Cox // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99, №. 16. – P. 10748-10752.
79. Kim, H. S. DJ-1 regulates mast cell activation and IgE-mediated allergic responses / H. S. Kim, A. R. Kim, J. H. Kim, B. Kim, G. Noh, H. S. Kim, W. S. Choi // *J. Allergy Clin Immunol.* – 2013. – V. 131, №. 6. – P. 1653-1662.
80. Kim, Y. Y. 2-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid attenuates mast cell-mediated allergic reaction in mice via modulation of the FcεRI signaling pathway / Y. Y. Kim, I. G. Je, M. J. Kim, B. C. Kang, Y. A. Choi, M. C. Baek, B. Lee, J. K. Choi, H. R. Park, T. Y. Shin, S. Lee, S. B. Yoon, S. R. Lee, D. Khang, S. H. Kim // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2017. – V. 38, №. 1. – P. 90-99.
81. Kulka, M. Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3 / M. Kulka, L. Alexopoulou, R. A.

- Flavell, D. D. Metcalfe // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – V. 114, №. 1. – P. 174-182.
- 82.Lee, D. M. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. / D. M. Lee, D. S. Friend, M. F. Gurish, C. Benoist, D. Mathis // *Science.* – 2002. – V. 297, №. 5587. – P. 1689-1692.
- 83.Liang, Q. L. Immune-related gene expression in response to A/H5N1 avian influenza virus infection in chicken and duck embryonic fibroblasts / Q. L. Liang, J. Luo, K. Zhou, J. X. Dong, H. X. He // *Mol. Immunol.* – 2011. – V. 48, №. 6-7. – P. 924-930.
- 84.Lin, T. K. Topical antihistamines display potent anti-inflammatory activity linked in part to enhanced permeability barrier function / T. K. Lin, M. Q. Man, J. L. Santiago, K. Park, T. Roelandt, Y. Oda, M. Hupe, D. Crumrine, H. J. Lee, M. Gschwandtner, J. P. Thyssen, C. Trullas, E. Tschachler, K. R. Feingold, P. M. Elias // *J. Invest. Dermatol.* – 2013. – V. 133, №. 2. – P. 469-447.
- 85.Liu, B. Apoptosis and pro-inflammatory cytokine response of mast cells induced by influenza A viruses / B. Liu, D. Meng, T. Wei, S. Zhang, Y. Hu, M. Wang // *PLoS One.* – 2014. – V. 9, №. 6. – P. e100109.
- 86.Liu, H. Altered mast cell activity in response to rhinovirus infection provides novel insight into asthma / H. Liu, J. Tan, J. Liu, H. Feng, D. Pan // *J. Asthma.* – 2020. – V. 57, №. 5. – P. 459-467.
- 87.Londono-Renteria, B. Role of Mast Cells in Dengue Virus Pathogenesis / B. Londono-Renteria, J. C. Marinez-Angarita, A. Troupin, T. M. Colpitts // *DNA Cell Biol.* – 2017. – V. 36, №. 6. – P. 423-427.
- 88.Lotfi-Emran, S. Human mast cells present antigen to autologous CD4+ T cells / S. Lotfi-Emran, B. R. Ward, Q. T. Le, A. L. Pozez, M. H. Manjili, J. A. Woodfolk, L. B. Schwartz // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2018. – V. 141, №. 1 – P. 311-321.

89. Lotzova, E. Role of interleukin-2 activated MHC-nonrestricted lymphocytes in antileukemia activity and therapy // *Leuk. Lymphoma.* – 1992. – V. 7, №. 1-2. – P.15-28.
90. Lu, X. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (A/H5N1) viruses isolated from humans / X. Lu, T. M. Tumpey, T. Morken, S. R. Zaki, N. J. Cox, J. M. Katz // *J. Virol.* – 1999. – V. 73, №. 7. – P. 5903-5911.
91. Lux, A. Of mice and men: the need for humanized mouse models to study human IgG activity in vivo / A. Lux, F. Nimmerjahn // *J. Clin. Immunol.* – 2013. – V. 33. – P. 4-8.
92. Macioła, A. K. The length of N-glycans of recombinant A/H5N1 hemagglutinin influences the oligomerization and immunogenicity of vaccine antigen / A. K. Macioła, M. A. Pietrzak, P. Kosson, M. Czarnocki-Cieciura, K. Śmietanka, Z. Minta, E. Kopera // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 444.
93. Mady, B. J. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection mediated by bispecific antibodies against cell surface molecules other than Fc gamma receptors / B. J. Mady, D. V. Erbe, I. Kurane, M. W. Fanger, F. A. Ennis // *J. Immunol.* – 1991. – V. 147, №. 9. – P. 3139-3144.
94. Maines, T. R. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. / T. R. Maines, A. Jayaraman, J. A. Belser, D. A. Wadford, C. Pappas, H. Zeng, K. M. Gustin, M. B. Pearce, K. Viswanathan, Z. H. Shriver, R. Raman, N. J. Cox, R. Sasisekharan, J. M. Katz, T. M. Tumpey // *Science.* – 2009. – V. 325, №. 5939. – P. 484-487.
95. Malbec, O. Fc epsilon receptor I-associated lyn-dependent phosphorylation of Fc gamma receptor IIB during negative regulation of mast cell activation / O. Malbec, D. C. Fong, M. Turner, V. L. Tybulewicz, J. C. Cambier, W. H. Fridman, M. Daëron // *J. Immunol.* – 1998. – V. 160, №4. – P. 1647-1658.

96. Malbec, O. Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells / O. Malbec, K. Roget, C. Schiffer, B. Iannascoli, A. R. Dumas, M. Arock, M. Daëron // *J Immunol.* – 2007. – V. 178, №. 10. – P. 6465-6475.
97. Malbec, O. The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation / O. Malbec, M. Daëron // *Immunol. Rev.* – 2007. – V. 217, №. 1. – P. 206-221.
98. Marshall, J. S. Mast-cell responses to pathogens // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004 – V. 4, №. 10 – P. 787-799.
99. Matsuoka, Y The mouse model for influenza / Y. Matsuoka, E. W. Lamirande, K. Subbarao // *Curr. Protoc. Microbiol.* – 2009. – V. 13, №. 1. – P. 15G. 3.1-15G. 3.30.
100. McDonald, E. M. Zika virus Replication in Myeloid Cells during Acute Infection Is Vital to Viral Dissemination and Pathogenesis in a Mouse Model / E. M. McDonald, J. Anderson, J. Wilusz, G. D. Ebel, A. C. Brault // *J. Virol.* – 2020. – V. 94, №. 21. – P. 10.1128/jvi. 00838-20.
101. McLachlan, J. B. Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection / J. B. McLachlan, J. P. Hart, S. V. Pizzo, C. P. Shelburne, H. F. Staats, M. D. Gunn, S. N. Abraham // *Nat. Immunol.* – 2003. – V. 4, №. 12. – P. 1199-1205.
102. Miyajima, I. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE-or IgG1-dependent passive anaphylaxis / I. Miyajima, D. Dombrowicz, T. R. Martin, J. V. Ravetch, J. P. Kinet, S. J. Galli // *J. Clin. Invest.* – 1997. – V. 99, №. 5. – P. 901-914.
103. Möllerherm, H. Antimicrobial activity of mast cells: role and relevance of extracellular DNA traps / H. Möllerherm, M. von Köckritz-Blickwede, K. Branitzki-Heinemann // *Front. Immunol.* – 2016. – V. 7 – P. 265.

104. Monsalvo, A. C. Severe pandemic 2009 H1N1 influenza disease due to pathogenic immune complexes / A. C. Monsalvo, J. P. Batalle, M. F. Lopez, J. C. Krause, J. Klemenc, J. Z. Hernandez, B. Maskin, J. Bugna, C. Rubinstein, L. Aguilar, L. Dalurzo, R. Libster, V. Savy, E. Baumeister, L. Aguilar, G. Cabral, J. Font, L. Solari, K. P. Weller, J. Johnson, F. P. Polack // *Nat. med.* – 2011. – V. 17, №. 2. – P. 195-201.
105. Morens, D. M. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease // *Clin. Infect. Dis.* – 1994. – V. 19, №. 3. – P. 500-512.
106. Morris Jr, S. M. Arginine: master and commander in innate immune responses // *Sci. Signal.* – 2010. – V. 3, №. 135. – P. pe27.
107. Mount, A. M. Mouse models of viral infection: influenza infection in the lung / A. M. Mount, G. T. Belz // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – V.595. – P. 299-318.
108. Mu, J. SARS-CoV-2 N protein antagonizes type I interferon signaling by suppressing phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 and STAT2 / J. Mu, Y. Fang, Q. Yang, T. Shu, A. Wang, M. Huang, L. Jin, F. Deng, Y. Qiu, X. Zhou // *Cell. Discov.* – 2020. – V. 6, №. 1. – P. 65.
109. Mukai, K. IgE and mast cells in host defense against parasites and venoms / K. Mukai, , M. Tsai, P. Starkl, T. Marichal, S. J. Galli // *Sem. Immunopath.* –2016. – V. 38. – P. 581-603.
110. Nader, P. R. Atypical exanthem following exposure to natural measles: eleven cases in children previously inoculated with killed vaccine / P. R. Nader, M. S. Horwitz, J. Rousseau // *J. Pediat.* – 1968. – V.72, №.1. – P. 22-28.
111. Narasaraju, T. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis / T. Narasaraju, M. K. Sim, H. H. Ng, M. C. Phoon, N. Shanker, S. K. Lal, V. T. Chow // *Microb. Infect.* – 2009. – V. 11, №. 1. – P. 2-11.

112. Ng, K. Responses of human mast cells and epithelial cells following exposure to influenza A virus / K. Ng, J. Raheem, C. D. St Laurent, C. T. Marcet, H. Vliagoftis, A. D. T. C. Befus // *Antiviral. Res.* – 2019. – V. 171. – P. 104566.
113. O'Donnell, C. D., K. Subbarao The contribution of animal models to the understanding of the host range and virulence of influenza A viruses / C.D. O'Donnell, K. Subbarao // *Microb. Infect.* – 2011. – V. 13, №. 5. – P. 502-515
114. Ochiai, H. Infection enhancement of influenza A NWS virus in primary murine macrophages by anti-hemagglutinin monoclonal antibody / H. Ochiai, M. Kurokawa, S. Matsui, T. Yamamoto, Y. Kuroki, C. Kishimoto, K. Shiraki // *J. Med. Virol.* – 1992. – V. 36, №. 3. – P. 217-221.
115. Oliva, A. Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro / A. Oliva, A. L. Kinter, M. Vaccarezza, A. Rubbert, A. Catanzaro, S. Moir, J. Monaco, L. Ehler, S. Mizell, R. Jackson, Y. Li, J. W. Romano, A. S. Fauci // *J. Clin. Invest.* – 1998. – V. 102, №. 1. – P. 223-231.
116. Pawełczyk, M. The role of human parainfluenza virus infections in the immunopathology of the respiratory tract / M. Pawełczyk, M. L. Kowalski // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2017. – V. 17, №3. – P. 16.
117. Peiris, J. S. Re-emergence of fatal human influenza A subtype A/H5N1 disease / J. S. Peiris, W. C. Yu, C. W. Leung, C. Y. Cheung, W. F. Ng, J. M. Nicholls, T. K. Ng, K. H. Chan, S. T. Lai, W. L. Lim, K. Y. Yuen, Y. Guan // *Lancet.* – 2004. – V. 363, №. 9409. – P. 617-619.
118. Pelaia, G. Respiratory infections and asthma / G. Pelaia, A. Vatrella, L. Gallelli, T. Renda, M. Cazzola, R. Maselli, S. A. Marsico // *Respir. Med.* – 2006. – V. 100, №. 5. – P. 775-784

119. Portales-Cervantes, L. Human Mast Cells Enhance Natural Killer Cell Functions / L. Portales-Cervantes, I. D. Haidl, P. W. Lee, J. S. Marshall // *J. Innate Immun.* – 2017. – V. 9, №. 1. – P. 94-108.
120. Prussin, C. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils / C. Prussin, D. D. Metcalfe // *J. Allerg. Clin. Immunol.* – 2006. – V. 117, №. 2. – P. S450-S456.
121. Rajao, D. S. Heterologous challenge in the presence of maternally-derived antibodies results in vaccine-associated enhanced respiratory disease in weaned piglets / D. S. Rajao, M. R. Sandbulte, P. C. Gauger, P. Kitikoon, R. Platt, J. A. Roth, D. R. Perez, C. L. Loving, A. L. Vincent // *Virology.* – 2016. – V. 491. – P. 79-88.
122. Rathore, A. P. Protective and pathogenic roles for mast cells during viral infections / A. P. Rathore, A. L. St John // *Curr. Opin. Immunol.* – 2020. – V. 66. – P. 74-81.
123. Raut, S. The pathogenesis of infections of the mouse caused by virulent and avirulent variants of an influenza virus / S. Raut, J. Hurd, R. J. Cureton, G. Blandford, R. B. Heath // *J. Med. Microbiol.* – 1975. – V. 8, №. 1. – P. 127-136.
124. Reeves, S. R. Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Lung Fibroblasts Induces a Hyaluronan-Enriched Extracellular Matrix That Binds Mast Cells and Enhances Expression of Mast Cell Proteases / S. R. Reeves, K. A. Barrow, L. M. Rich, M. P. White, N. J. Shubin, C. K. Chan, I. Kang, S. F. Ziegler, A. M. Piliponsky, T. N. Wight, J. S. Debley // *Front. Immunol.* – 2020. – V. 10. – P. 3159.
125. Ribatti, D. The controversial role of mast cells in tumor growth / D. Ribatti, E. Crivellato // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* —2009, № 275. — P. 89–131.

126. Ricke, D. O. Two different antibody-dependent enhancement (ADE) risks for SARS-CoV-2 antibodies // *Front. Immunol.* – 2021. V.12. – P. 640093.
127. Rodrigue-Gervais, I. G. Cellular inhibitor of apoptosis protein cIAP2 protects against pulmonary tissue necrosis during influenza virus infection to promote host survival / I. G. Rodrigue-Gervais, K. Labbé, M. Dagenais, J. Dupaul-Chicoine, C. Champagne, A. Morizot, A. Skeldon, E. L. Brincks, S. M. Vidal, T. S. Griffith, M. Saleh // *Cell. Host Microbe.* – 2014. – V. 15, №. 1. – P. 23-35.
128. Rosales, C. Fc receptors: Cell activators of antibody functions / C. Rosales, E. Uribe-Querol // *Adv. Biosci. Biotechnol.* – 2013. – V. 4 №. 4. – P. 21-33.
129. Rosales, C. Fc γ Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 280.
130. Rowe, T. Detection of antibody to avian influenza A (A/H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. / T. Rowe, R. A. Abernathy, J. Hu-Primmer, W. W. Thompson, , X. Lu, W. Lim, K. Fukuda, N. J. Cox, J. M. Katz // *Clin Microbiol.* – 1999. – V. 37, №. 4. – P. 937-943.
131. Sakabe, S. Cytokine production by primary human macrophages infected with highly pathogenic A/H5N1 or pandemic H1N1 2009 influenza viruses / S. Sakabe, K. Iwatsuki-Horimoto, R. Takano, C. A. Nidom, M. T. Q. Le, T. Nagamura-Inoue, T. Horimoto, N. Yamashita, Y. Kawaoka // *J. Gener. Virol.* – 2011. - V. 92 (Pt 6). – P. 1428–1434.
132. Schiller, M. Neuronal regulation of immunity: why, how and where? / M. Schiller, T. L. Ben-Shaan, A. Rolls // *Nat. Rev. Immunol.* – 2021. – V. 21, №. 1. – P. 20-36.
133. Seidel, U. J. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies / U. J. Seidel, P. Schlegel, P. Lang // *Front. Immunol.* – 2013. – V. 4. – P. 76.

134. Seneviratne, S. L. Mast cell disorders in Ehlers–Danlos syndrome / S. L. Seneviratne, A. Maitland, L. Afrin // *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* – 2017. – V. 175, №. 1. – P. 226-236.
135. Shemesh, M. SARS-CoV-2 suppresses IFN β production mediated by NSP1, 5, 6, 15, ORF6 and ORF7b but does not suppress the effects of added interferon / M. Shemesh, T. E. Aktepe, J. M. Deerain, J. L. McAuley, M. D. Audsley, C. T. David, D. F. J. Purcell, V. Urin, R. Hartmann, G. W. Moseley, J. M. Mackenzie, G. Schreiber, D. Harari // *PLoS Pathog.* – 2021. – V. 17, №. 8. – P. e1009800.
136. Shore, P. A. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues / P. A. Shore, A. Burkhalter, V. H Cohn // *Pharmacol. Exp. Ther.* – 1959. – V. 127, №. 3. – P. 182-186.
137. Skowronski, D. M. Association between the 2008-09 seasonal influenza vaccine and pandemic H1N1 illness during Spring-Summer 2009: four observational studies from Canada / D. M. Skowronski, G. De Serres, N. S. Crowcroft, N. Z. Janjua, N. Boulianne, T. S. Hottes, L. C. Rosella, J. A. Dickinson, R. Gilca, P. Sethi, N. Ouhoumane, D. J. Willison, I. Rouleau, M. Petric, K. Fonseca, S. J. Drews, A. Rebbapragada, H. Charest, M. E. Hamelin, G. Boivin // *PLoS Medicine.* – 2010. – V. 7, №. 4. – P. e1000258.
138. Soehnlein, O. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment / Soehnlein, O. L. Lindbom, C. Weber // *Blood.* – 2009. – V. 114, №. 21. – P. 4613-4623.
139. Spesock, A. The virulence of 1997 A/H5N1 influenza viruses in the mouse model is increased by correcting a defect in their NS1 proteins / A. Spesock, M. Malur, M. J. Hossain, L. M. Chen, B. L. Njaa, C. T. Davis, R. O. Donis // *J. Virol.* – 2011. – V. 85, №. 14. – P. 7048-7058.
140. St. John, A. L. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance / A. L. St. John, A. P. Rathore, H. Yap, M. L. Ng, D. D. Metcalfe,

- S. G. Vasudevan, S. N. Abraham // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108, №. 22. – P. 9190-9195.
141. Stancioiu, F. A. dissection of SARS-CoV2 with clinical implications (Review) / F. Stancioiu, G. Z. Papadakis, S. Kteniadakis, B. N. Izotov, M. D. Coleman, D. A. Spandidos, A. Tsatsakis // *Int. J. Mol. Med.* – 2020. – V. 46, №. 2. – P. 489-508.
142. Stelekati, E. Mast cell-mediated antigen presentation regulates CD8+ T cell effector functions / E. Stelekati, R. Bahri, O. D'Orlando, Z. Orinska, H. W. Mittrücker, R. Langenhaun, M. Glatzel, A. Bollinger, R. Paus, S. Bulfone-Paus // *Immunity.* – 2009. – V. 31, №. 4. – P. 665-676.
143. Tamura, M. Antibodies to HA and NA augment uptake of influenza A viruses into cells via Fc receptor entry / M. Tamura, R. G. Webster, F. A. Ennis // *Virology.* – 1991. – V. 182, №. 1. – P. 211-219.
144. Tamura, M. Subtype cross-reactive, infection-enhancing antibody responses to influenza A viruses / M. Tamura, R. G. Webster, F. A. Ennis // *J. Virol.* – 1994. – V. 68, №. 6. – P. 3499-3504.
145. Thangam, E. B. The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: the hunt for new therapeutic targets / E. B. Thangam, E. A. Jemima, H. Singh, M. S. Baig, M. Khan, C. B. Mathias, R. Saluja // *Front. Immunol.* – 2018. – V. 9. – P. 1873.
146. Thein, S. Risk factors in dengue shock syndrome / S. Thein, M. M. Aung, T. N. Shwe, M. Y. O. Aye, A. Zaw, K. Aye, J. Aaskov // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1997. – V. 56, №. 5. – P. 566-572.
147. Tisoncik, J. R. Into the eye of the cytokine storm / J. R. Tisoncik, M. J. Korth, C. P. Simmons, J. Farrar, T. R. Martin, M. G. Katze // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2012. – V. 76, №. 1. – P. 16-32.
148. Tkaczyk, C. Fcγ receptors on mast cells: activatory and inhibitory regulation of mediator release / C. Tkaczyk, Y. Okayama, D. D. Metcalfe, A.

- M. Gilfillan // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2004. – V. 133, №. 3. – P. 305-315.
149. Treanor, J. J. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (A/H5N1) vaccine / J. J. Treanor, J. D. Campbell, K. M. Zangwill, T. Rowe, M. Wolff // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – V. 354, №. 13. – P. 1343-1351.
150. Tripp R. A. Animal models for evaluation of influenza vaccines / R. A. Tripp, S. M. Tompkins // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2009. – V.333. - P. 397-412.
151. Tsai B. Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2007. – V. 23. – P. 23-43.
152. Valadi, H. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells / H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, J. O. Lötvall // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – V. 9, №. 6. – P. 654-659.
153. Van Der Laan, J. W. Animal models in influenza vaccine testing / J. W. Van Der Laan, C. Herberts, R. Lambkin-Williams, A. Boyers, A. J. Mann, J. Oxford // *Expert Rev. Vaccines.* – 2008. – V. 7, №. 6. – P. 783-793.
154. Vanderven, H. A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity and influenza virus / H. A. Vanderven, S. Jegaskanda, A. K. Wheatley, S. J. Kent // *Curr. Opin. Virol.* – 2017. – V. 22. – P. 89-96.
155. Vidarsson, G. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions / G. Vidarsson, G. Dekkers, T. Rispens // *Front. Immunol.* – 2014. – V. 5. – P. 520.
156. Wang, C. Geldanamycin Reduces Acute Respiratory Distress Syndrome and Promotes the Survival of Mice Infected with the Highly Virulent A/H5N1 Influenza Virus / C. Wang, P. Liu, J. Luo, H. Ding, Y. Gao, L. Sun, F. Luo, X. Liu, H. He // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2017. – V. 7. – P. 267.

157. Wang, K. Viral proteins function as ion channels / K. Wang, S. Xie, B. Sun // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1808, №. 2. – P. 510-515.
158. Wang, S. F. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins / S. F. Wang, S. P. Tseng, C. H. Yen, J. Y. Yang, C. H. Tsao, C. W. Shen, K. H. Chen, F. T. Liu, W. T. Liu, Y. M. Chen, J. C. Huang // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – V. 451, №. 2. – P. 208-214.
159. Wang, S. Nizatidine, a small molecular compound, enhances killed A/H5N1 vaccine cell-mediated responses and protects mice from lethal viral challenge / S. Wang, B. Wu, J. Xue, M. Wang, R. Chen, B. Wang // *Hum. Vaccin Immunother.* – 2014. – V. 10, №. 2. – P. 461-468.
160. Ward, A. C. Virulence of influenza A virus for mouse lung // *Virus genes.* – 1997. – V. 14, №3. – P. 187-194.
161. Ward, M. C. Neurovirulence of influenza A virus // *J. Neurovirol.* – 1996. – V. 2, №. 3. – P. 139-151.
162. Webster, R. G. Cross-protection and cross-reactive cytotoxic T cells induced by influenza virus vaccines in mice / R. G. Webster, B. A. Askonas // *Eur. J. Immunol.* – 1980. – V. 10, №. 5. – P. 396-401.
163. Wegman, A. D. Monomeric IgA Antagonizes IgG-Mediated Enhancement of DENV Infection / A. D Wegman, H. Fang, A. L. Rothman, S. J. Thomas, T. P. Endy, M. K. McCracken, J. R. Currier, H. Friberg, G. D. Gromowski, A. T. Waickman // *Front. Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 777672.
164. Weigand, L. A. Mast cell-cholinergic nerve interaction in mouse airways / L. A. Weigand, A. C. Myers, S. Meeker, B. J. Udem // *J. Physiol.* – 2009. – V. 587, №. 13. – P. 3355-3362.
165. Werfel, T. Activation of cloned human natural killer cells via Fc gamma RIII / T. Werfel, P. Uciechowski, P. A. Tetteroo, R. Kurrle, H. Deicher, R. E. Schmidt // *J. Immunol.* – 1989. – V. 142, №. 4. – P. 1102-1106.

166. Wilhelm, M. Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation / M. Wilhelm, R. Silver, A. J. Silverman // *Eur. J. Neurosci.* – 2005. – V. 22, №. 9. – P. 2238-2248.
167. Wong, J. P. Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection / J. P. Wong, M. E Christopher, S. Viswanathan, N. Karpoff, X. Dai, D. Das, L. Q. Sun, M. Wang, A. M. Salazar // *Vaccine.* – 2009. – V. 27, №. 25-26. – P. 3481-3483.
168. Wu, H. iTRAQ-based proteomic and bioinformatic characterization of human mast cells upon infection by the influenza A virus strains H1N1 and A/H5N1 / H. Wu, S. Zhang, C. Huo, S. Zou, Z. Lian, Y. Hu // *FEBS letters.* – 2019. – V. 593, №. 18. – P. 2612-2627.
169. Xu, L. The mouse and ferret models for studying the novel avian-origin human influenza A (H7N9) virus / L. Xu, L. Bao, W. Deng, H. Zhu, T. Chen, Q. Lv, F. Li, J. Yuan, Z. Xiang, K. Gao, Y. Xu, L. Huang, Y. Li, Liu J, Y. Yao, P. Yu, W. Yong, Q. Wei, L. Zhang, C. Qin // *Virology.* – 2013. – V. 10, №. 1. – P. 1-8.
170. Yin, Y. Extracellular vesicles from mast cells induce mesenchymal transition in airway epithelial cells / Y. Yin, G. V. Shelke, C. Lässer, H. Brismar, J. Lötvall // *Respir. Res.* – 2020. – V. 21, №. 1. – P. 1-13.
171. Yoo, J. S. SARS-CoV-2 inhibits induction of the MHC class I pathway by targeting the STAT1-IRF1-NLRC5 axis / J. S. Yoo, M. Sasaki, S. X. Cho, Y. Kasuga, B. Zhu, R. Ouda, Y. Orba, P. de Figueiredo, H. Sawa, K. S. Kobayashi // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12, №. 1. – P. 6602.
172. Yuen, C. K. SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists / C. K. Yuen, J. Y. Lam, W. M. Wong, L. F. Mak, X. Wang, H. Chu, J. P. Cai, D. Y. Jin, K. K. To, J. F. Chan, K. Y. Yuen, K. H. Kok // *Emerg. Microbes Infect.* – 2020. – V. 9, №. 1. – P. 1418-1428.
173. Zanvit, P. Immune response after adjuvant mucosal immunization of mice with inactivated influenza virus / P. Zanvit, M. Havlíčková, J. Táčner, M.

- Jirkovská, P. Petrásková, O. Novotná, D. Cechová, J. Julák, I. Sterzl, L. Prokesová // *Immunol. Lett.* – 2005. – V. 97, №. 2. – P. 251-259.
174. Zarnegar, B. Innate Immunity Induces the Accumulation of Lung Mast Cells During Influenza Infection / B. Zarnegar, A. Westin, S. Evangelidou, J. Hallgren // *Front. Immunol.* – 2018. – V. 9. – P. 2288.

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.