

7. Шурыгина И.А. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани / Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Аюшинова Н.И., Кая О.В. // Сибирский медицинский журнал Иркутск. -2012. -№3. -С.8-12.
8. Sharifi S., Mohseni R., Amiri I., Tavilani H. Sperm matrix metalloproteinase-2 activity increased in pregnant

couples treated with intrauterine insemination: a prospective case control study / Sharifi S., Mohseni R., Amiri I., Tavilani H. // J Obstet Gynaecol. -2019. -P.1-6.

## РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ НЕЙТРОФИЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ НА МЫШАХ

Никольский А.А.<sup>1</sup>, Шиловский И.П.<sup>1</sup>, Барвинская Е.Д.<sup>1</sup>, Вишнякова Л.И.<sup>1</sup>,  
Бабахин А.А.<sup>1</sup>, Гайсина А.Р.<sup>1</sup>, Хайтов М.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

## DEVELOPMENT OF NEUTROPHILIC BRONCHIAL ASTHMA MODEL IN MICE

Nikolskii A.A.<sup>1</sup>, Shilovskiy I.P.<sup>1</sup>, Barvinskaya E.D.<sup>1</sup>, Vishnyakova L.I.<sup>1</sup>,  
Babakhin A.A.<sup>1</sup>, Gaisina A.R.<sup>1</sup>, Khaitov M.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> NRC «Institute of Immunology» FMBA, Russia, Moscow

Адрес для корреспонденции: 111539, г. Москва, ул. Реутовская, д.22/2, кв. 144

E-mail: aa.nikolskii@nrcii.ru

**Введение.** Бронхиальная астма (БА) – это хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, характеризующееся обратимой бронхиальной обструкцией и гиперреактивностью бронхов. На сегодняшний день БА является наиболее распространенным во всем мире хроническим воспалительным заболеванием дыхательных путей, представляющим значительную социальную проблему, как для детей, так и для взрослых [11]. У большинства больных БА происходит инфильтрация в ткань легких двух типов провоспалительных клеток: эозинофилов и нейтрофилов [6], с преобладанием тех или иных, что, в свою очередь, обуславливает различия в течении БА у больных. Эозинофильное воспаление преимущественно связано с легкой и умеренной БА, хотя наблюдается и при тяжелой неконтролируемой болезни, тогда как нейтрофильное воспаление происходит главным образом при более тяжелой форме БА [7]. Эозинофильная астма включает как аллергические, так и неаллергические эндотипы, в основе которых лежат иммунные реакции, опосредуемые цитокинами, продуцируемыми Т-хелперами 2 типа (Th2-клетками), тогда как нейтрофильная астма главным образом базируется на механизмах, опосредуемых Th1- и Th17-клетками [4]. Данные иммунновоспалительные профили развиваются вследствие функционального нарушения Т-регуляторных (Treg) лимфоцитов, что способствует активации дендритных клеток, которые направляют дифференцировку наивных Th0-клеток в те или иные

подтипы Th-клеток. Нейтрофильный эндотип БА ассоциируется с агрессивным течением заболевания, выраженной деструкцией тканей и характеризуется низким ответом на стандартную терапию кортикостероидами [5, 9]. Все вышесказанное создает необходимость в создании новых лекарственных препаратов для терапии нейтрофильной астмы, для чего необходимо создание адекватных моделей данного заболевания на животных. В тоже время наиболее удобным видом для создания экспериментальных моделей являются мыши ввиду их не высокой стоимости, а также значительного разнообразия молекулярно-генетического инструментария [1, 2, 8, 10]. Поэтому целью работы было создание экспериментальной модели нейтрофильной БА у мышей.

**Материалы и методы.** Экспериментальные данные были получены с использованием мышей-самок линии BALB/c весом 20-22 г, в возрасте 6-8 недель, полученных из питомника «Столбовая» ГУНЦ БМТ РАМН. При поступлении из питомника животные сначала были помещены в карантинную зону на 7 дней, в течение которых проводили ежедневное обследование состояния животных. При формировании экспериментальных групп в качестве критерия отбора использовали показатель массы тела так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения более чем на 10%. Мыши были разделены на 4 группы. Группу 1 иммунизировали внутрибрюшинно (в/б) 20 мкг/мышь овальбумина куриного яйца (OVA), эмульгированного

в  $Al(OH)_3$ , 3 раза с 2-недельными интервалами. Группа 2 была иммунизирована в/б OVA вместе с адьювантом Фрейнда (FA). В дни эксперимента 42-44 обе группы были помещены в ингаляционные камеры для провокации аллергического воспаления модельным аллергеном OVA. Группа 3 была иммунизирована внутрибрюшинно OVA в комплексе с FA. В дни 42-44 у этих мышей проводили провокацию смесью OVA и липополисахарида (LPS), полученного из *E.coli*. Мышей в группе 4 иммунизировали и провоцировали натрий-фосфатным буфером (PBS). Через 24 часа после провокации измеряли гиперреактивность дыхательных путей с помощью неинвазивной плетизмографии. Образцы сыворотки крови были взяты из ретроорбитального синуса анестезированных мышей. Далее с помощью ИФА были определены уровни сывороточных анти-OVA специфических IgE-, IgG1- и IgG2a-антител. Через 48 часов после провокации собирали бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) для дифференциального подсчета лейкоцитов методом световой микроскопии. В клетках БАЛ, при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-time PCR), определяли экспрессию генов, отвечающих за различные иммунновоспалительные профили.

**Результаты.** Все 3 группы, иммунизированные аллергеном, продемонстрировали высокий уровень антител в сыворотке по сравнению с интактными мышами. Уровень IgG1 у мышей, иммунизированных смесью OVA и FA, был выше, чем у мышей, иммунизированных смесью OVA и гидроксида алюминия. Было показано, что все 3 экспериментальные группы, которые получали OVA, демонстрировали на 30% более высокий уровень гиперреактивности бронхов (ГРБ) в ответ на вдыхание возрастающих концентраций метахолина по сравнению с контрольной группой. Повышение ГРБ у этих групп мышей можно объяснить тем фактом, что оба протокола иммунизации OVA обеспечивают одинаково высокие уровни специфических антител IgE, которые являются одним из ключевых медиаторов развития гиперреактивности дыхательных путей у больных астмой. Анализ клеточного состава БАЛ показал преимущественную инфильтрацию легких эозинофилами после иммунизации смесью OVA и гидроксида алюминия (около  $45\ 000 \pm 2\ 000$  кл/мл). У мышей, иммунизированных смесью OVA и FA с последующей провокацией исключительно OVA, наблюдалось повышение уровня нейтрофилов (около  $4\ 000 \pm 500$  кл/мл) и снижение количества эозинофилов до  $7\ 000 \pm 500$  кл/мл клеток. Наибольшее количество нейтрофилов в БАЛ было обнаружено у мышей, спровоцированных смесью OVA и LPS ( $40\ 000 \pm 2\ 000$  кл/мл), при этом эозинофилы в БАЛ не выявлялись. Гистологический анализ тканей легких подтвердил данные, полученные при подсчете

клеточного состава БАЛ; наиболее выраженная инфильтрация легких нейтрофилами наблюдалась у мышей, получавших аэрозольную провокацию смесью OVA и LPS. В то же время у мышей, иммунизированных смесью OVA и гидроксида алюминия, наблюдалась инфильтрация легких эозинофилами. Кроме того, гистологический анализ выявил повышенную метаплазию и гиперплазию эпителиальных клеток бронхов во всех трех экспериментальных группах.

Таким образом, проведенный эксперимент показал заметную инфильтрацию легких нейтрофилами в группе мышей №3, которых иммунизировали смесью OVA и FA с последующей провокацией смесью OVA и LPS. Чтобы установить преобладающий тип иммунного ответа, мы проанализировали экспрессию цитокинов в клетках БАЛ, взятых от этих мышей, с использованием метода Real-time PCR. Проведенный анализ выявил 3,5-кратное повышение уровня экспрессии гена интерлейкина-4 (IL-4) – маркера Th2-иммунного ответа и 7,5-кратное повышение уровня экспрессии гена интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) – маркера Th1-иммунного ответа, по сравнению с контрольной группой №4. В то же время уровень экспрессии IL-17F (маркер Th17-иммунного ответа) был увеличен в 10 раз, по сравнению с контрольной группой. Эти данные указывают на более существенную поляризацию иммунного ответа по направлению к Th17-типу в группе с LPS.

**Заключение.** Таким образом, можно сделать вывод, что иммунизация мышей специфическим аллергеном вместе с адьювантом Фрейнда и с последующим аэрозольным введением того же аллергена в смеси с LPS приводит к развитию экспериментальных признаков БА с нейтрофильным эндотипом: наличие специфических антител IgE, IgG1, IgG2a в сыворотке, увеличение ГРБ на 30%, увеличенное накопление нейтрофилов в легких. Анализ уровней экспрессии маркерных генов показал, что вышеуказанные признаки нейтрофильной БА у мышей развиваются посредством Th17-зависимого механизма, что сходно с клинической картиной, наблюдаемой у человека. Созданная модель может быть использована как для тестирования новых противоастматических препаратов [3], так и для изучения молекулярных механизмов патологии.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации № МД-1578.2019.4.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Бабахин А.А. [и др.]. Модель экспериментальной бронхиальной астмы, индуцированной у мышей аллергенным экстрактом из клещей домашней пыли *Dematophagoides pteronyssinus* // Российский аллергологический журнал. 2015. (6). С. 25–33.

2. Шиловский И.П. [и др.]. Разработка безадыювантной модели хронической бронхиальной астмы у мышей // Российский иммунологический журнал. 2014. № 17 (3). С. 638–641.
3. Шиловский И.П. [и др.]. Интерференция РНК – новый подход в терапии аллергической бронхиальной астмы // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2016. № 4 (79). С. 35–44.
4. Al-Ramli W. [и др.]. TNF17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma // Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2009. № 5 (123). С. 1185–1187.
5. Campo P. [и др.]. Phenotypes and endotypes of uncontrolled severe asthma: New Treatments // Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. 2013. № 2 (23). С. 76–88.
6. Dougherty R.H., Fahy J. V. Acute exacerbations of asthma: Epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype // Clinical and Experimental Allergy. 2009. № 2 (39). С. 193–202.
7. Kitch B.T., Levy B.D., Fanta C.H. Epidemiology, Diagnosis and Treatment 2000. № 5 (17). С. 385–397.
8. Shilovskiy I.P. [и др.]. Adjuvant and adjuvant-free protocols produce similar phenotypes of allergic asthma in mice // Current trends in immunology. 2015. (16). С. 79–91.
9. Shilovskiy I.P. [и др.]. Anticytokine therapy of allergic asthma // Molecular Biology. 2017. № 1 (51). С. 1–13.
10. Zosky G.R., Sly P.D. Animal models of asthma. // Clinical and experimental allergy. 2007. № 7 (37). С. 973–988.
11. Jackson D.J. et al. IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2014. Vol. 190, № 12. P. 1373–1382.

## ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С ТРАВМОЙ МОЗГА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Норка А.О.

Воробьев С.В., Кузнецова Р.Н., Кудрявцев И.В., Коваленко С.Н.

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П.Павлова,  
Санкт-Петербург

E-mail: norka-anna@mail.ru

## FEATURES OF THE IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY OF VARYING SEVERITY

Norka A.O.<sup>1</sup>, Vorobyev S.V.<sup>2</sup>, Kuznetsova R.N.<sup>3</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>4</sup>, Kovalenko S.N.<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Russia

<sup>2</sup> Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Russia

<sup>3</sup> Saint Petersburg Pauster Institute, Russia

<sup>4</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine», Russia

<sup>5</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy, Russia

<sup>6</sup> City Hospital No. 26, St. Petersburg, Russia.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из наиболее распространенных патологий центральной нервной системы в мире. При этом ее удельный вес составляет 25–40% от всех видов травм (1). Применение рутинных методов структурной нейровизуализации, таких как компьютерная и магнитно-резонансная томография (КТ и МРТ), проводимая в стандартных режимах, зачастую не позволяют своевременно оценить тяжесть произошедших нарушений на клеточном уровне. Это характерно, в первую очередь, для ЧМТ легкой степени тяжести, при которой наблюдается суб-

микроскопический уровень повреждения (2). Данное положение предопределяет необходимость поиска новых приемов дифференциальной диагностики тяжести ЧМТ и прогнозирования риска развития последствий.

В настоящее время большое внимание уделяется поиску биологических маркеров, которые бы отражали протекающие в травмированном мозге патохимические и патофизиологические процессы. Их обнаружение будет способствовать более информативной оценке имеющихся повреждений и правильному подбору терапевтической стратегии. Одним из таких перспективных