

Цитокины, обратная генетика и антицитокиновая терапия

Друцкая М.С.^{1,2}, Губернаторова Е.О.^{1,2}, Горшкова Е.А.^{1,2},
Атретханы К.-С.Н.^{1,2}, Носенко М.А.^{1,2}, Гоголева В.С.^{1,2},
Намаканова О.А.^{1,2}, Зварцев Р.В.¹, Круглов А.А.^{1,2}, Недоспасов С.А.^{1,2}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)
Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (МГУ им. М.В. Ломоносова)
Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1

РЕЗЮМЕ

Цитокины – молекулярный язык коммуникаций между клетками, используемый как для поддержания гомеостаза организма (в том числе иммунной системы), так и при различных заболеваниях. Многие аспекты воспаления, аутоиммунных заболеваний и неоплазий связаны с действием цитокинов через специфические рецепторы. Фундаментальную научную проблему представляют установление новых физиологических функций «старых» цитокинов, понимание молекулярных и клеточных механизмов их работы в заболеваниях, поиск новых терапевтических мишеней и разработка инновационных подходов к антицитокиновой терапии. При оценке грандиозного успеха антицитокиновой терапии в лечении некоторых аутоиммунных заболеваний нельзя забывать о том, что, во-первых, это лечение не устраняет причины заболевания – аутореактивных Т-клеточных клонов, во-вторых, на нее отвечает менее половины пациентов, и, в-третьих, у нее есть серьезные побочные эффекты.

Ключевые слова: TNF, IL-6, мышинные модели, биспецифические антитела, коллаген-индуцированный артрит, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, астма, гуманизированные мыши.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РФФИ № 14-25-00160.

Благодарности. Авторы благодарят А.В. Туманова, Д.В. Купраша, Г.А. Ефимова, С.В. Тиллиба, С.И. Гривенникова, С.В. Козлова, И.А. Муфазалова, К.В. Корнеева, А.В. Дейкина, Д.М. Чудакова, В.В. Мохонова, И.А. Астраханцеву за содействие этому исследованию.

Для цитирования: Друцкая М.С., Губернаторова Е.О., Горшкова Е.А., Атретханы К.-С.Н., Носенко М.А., Гоголева В.С., Намаканова О.А., Зварцев Р.В., Круглов А.А., Недоспасов С.А. Цитокины, обратная генетика и антицитокиновая терапия. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 38–48. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-38-48>.

УДК 616-097:577.112:615.37

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-38-48>

Cytokines, reverse genetics and anti-cytokine therapy

Drutskaya M.S.^{1,2}, Gubernatorova E.O.^{1,2}, Gorshkova E.A.^{1,2}, Athertkhany K.-S.N.^{1,2},
Nosenko M.A.^{1,2}, Gogoleva V.S.^{1,2}, Namakanova O.A.^{1,2}, Zvartsev R.V.¹,
Kruglov A.A.^{1,2}, Nedospasov S.A.^{1,2}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (EIMB RAS)
32, Vavilov Str., Moscow, 119991, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University (LMSU)
1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

ABSTRACT

Cytokines comprise the molecular language of communication between the cells, which is needed to maintain the homeostatic functions of the body (including the immune system) and mediate various diseases. Many aspects of inflammation, autoimmune diseases and neoplasia are associated with cytokine signaling through specific receptors. The establishment of new physiological functions of “old” cytokines and understanding the molecular and cellular mechanisms of their involvement in disease pathogenesis, as well as the search for new therapeutic targets and development of innovative approaches to anti-cytokine therapy, present a fundamental problem. When assessing the tremendous success of anti-cytokine therapy in treatment of certain autoimmune diseases, we should not forget that (a) this treatment does not eliminate the causes of the disease: autoreactive T-cell clones; and that (b) less than half of the patients respond to this therapy; and that (c) anti-cytokine therapy has serious side effects.

Key words: TNF, IL-6, mouse models, bispecific antibodies, collagen-induced arthritis, experimental autoimmune encephalomyelitis, asthma, humanized mice.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Source of funding. This study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 14-25-00160.

Acknowledgements. The authors would like to thank Tumanov A.V., Kuprash D.V., Efimov G.A., Tillib S.V., Grivennikov S.I., Kozlov S.V., Muphazalov I.A., Korneev K.V., Deikin A.V., Chudakov D.M., Mokhonov V.V., and Astrakhantseva I.A. for their valuable contribution to the study.

For citation: Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Athertkhany K.-S.N., Nosenko M.A., Gogoleva V.S., Namakanova O.A., Zvartsev R.V., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. Cytokines, reverse genetics and anti-cytokine therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 38–48. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-38-48>.

ВВЕДЕНИЕ

Цитокины – это молекулярный язык межклеточного общения, с помощью которого клетки – продуценты цитокинов посылают сигналы клеткам, несущим соответствующие высокоаффинные рецепторы. Цитокины могут действовать дистанционно, подобно гормонам, но чаще действуют на клетки того же гистологического компартмента, в том числе и при прямом клеточном контакте. Последствиями цитокиновых сигналов могут стать активация, пролиферация, дифференциров-

ка, выживание или программируемая клеточная гибель, которая включает не только апоптоз, но и некроптоз. Отдельный подкласс цитокинов, называемый хемокинами, передает инструкции по миграции клеток в направлении источника молекулярного сигнала. По механизму передачи сигнала рецепторы хемокинов принципиально отличаются от рецепторов всех других цитокинов и возникли очень рано в филогенезе.

Вся работа иммунной системы в значительной степени регулируется цитокинами, которые часто относят к гуморальным факторам иммунитета.

При этом часть цитокинов может действовать и в трансмембранной форме, просто в этом случае потребуются непосредственное взаимодействие двух клеток, а механизмы передачи внутриклеточного сигнала в клетке, несущей рецептор, останутся теми же самыми.

Цитокинов в организме около 100, и большинство из них входят в семейства, которые передают сигнал через похожие по структуре рецепторы. Этим и объясняется сходство физиологических эффектов родственных цитокинов. Важно, что исследования, основанные на технологиях обратной генетики, а также фармакологическая блокировка индивидуальных цитокинов привели к пониманию того, что, несмотря на присутствие в организме родственных молекул, практически у каждого исследованного цитокина есть какие-то невырожденные функции, отобранные эволюцией. Это последнее обстоятельство нетривиально и представляет большой интерес как для фундаментальной науки, так и для ее клинических приложений.

Хотя природные функции большинства цитокинов направлены на поддержание гомеостаза разных систем организма (не только иммунной!), а также на защиту от неблагоприятных воздействий, в случае неправильной регуляции те же сигнальные каскады могут приводить к патологическим состояниям. В частности, провоспалительные цитокины: фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF), интерлейкин (IL) 1, IL-6, IL-17, интерферон гамма (IFN γ) и другие при некоторых заболеваниях оказываются факторами патогенеза. Поэтому генетическая или фармакологическая блокировка этих цитокинов в модельных организмах может способствовать терапевтическому эффекту. Антицитокиновая терапия многих заболеваний, впервые примененная в середине 1990-х гг. для блокировки TNF у больных ревматоидным артритом [1], прочно вошла в арсенал практикующих врачей, причем спектр как самих цитокинов, так и показаний, при которых применение антицитокиновой терапии обосновано, неуклонно расширяется. Однако до сих пор не решены две фундаментальные проблемы: во-первых, как добиться того, чтобы анти-TNF или анти-IL-6 терапия была эффективна для большинства пациентов с аутоиммунитетом, и, во-вторых, как добиться того, чтобы эта терапия не вызывала осложнений, связанных с реактивацией бактериальных инфекций, в частности латентного туберкулеза. Кроме того, антицитокиновая терапия вмешивается в механизмы иммунорегуляции, но никак не затрагивает первопри-

чины аутоиммунных заболеваний: образования в организме аутореактивных Т- или В-клеточных клонов.

Наша лаборатория является признанным экспертом и лидером в изучении таких цитокинов, как TNF и лимфотоксин (LT). В последние годы к ним добавился IL-6, и на очереди находятся и некоторые другие цитокины. Нами были созданы десятки уникальных мышинных моделей, позволяющих изучать как эффекты генетического дефицита цитокина, так и последствия его контролируемой сверхэкспрессии.

Одно из направлений в исследовании физиологических функций цитокинов состоит в соотношении их защитных и патогенных функций (в случае модельных заболеваний) с конкретными типами клеток-продуцентов. Эта парадигма сформировалась в течение последних 10–15 лет в процессе изучения одного из самых интересных и плейотропных цитокинов – TNF.

Наши исследования *in vivo* базируются, в первую очередь, на инновационной приборной базе в виде уникальных мышинных моделей с генетическими локусами, отредактированными для решения конкретных фундаментальных задач иммунологии [2–4]. На создание базы ушло более 20 лет (первая работа опубликована в 1997 г.) [5]. Многие из созданных нами мышей уникальны и используются десятками лабораторий мира. Это позволяет нам участвовать в исследованиях, проведение которых самостоятельно было бы затруднено из-за проблем со специфическими моделями заболеваний (например, инфекционными), отсутствия специального оборудования (например, установок для прижизненного имиджинга) или недостаточной научной экспертизы (например, в области нейробиологии и физиологии сердечно-сосудистой системы).

TNF, LT, РЕЦЕПТОРЫ TNF И ANTI-TNF ТЕРАПИЯ

С использованием уникальных мышей, созданных с помощью технологий редактирования генома, были изучены особенности протекания экспериментальных заболеваний, таких как коллаген-индуцированный артрит, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ), экспериментальный колит, экспериментальные бактериальные инфекции, а также рак кожи и рак кишечника. В некоторых из этих моделей нами была впервые установлена патогенная роль TNF из ограниченного числа клеточных источников, в частности из миелоидных клеток [6, 7]. По крайней мере в двух моделях заболеваний –

коллаген-индуцированном артрите (рис. 1) и в экспериментальной туберкулезной инфекции –

TNF, продуцируемый Т-лимфоцитами, играл невырожденную защитную роль.

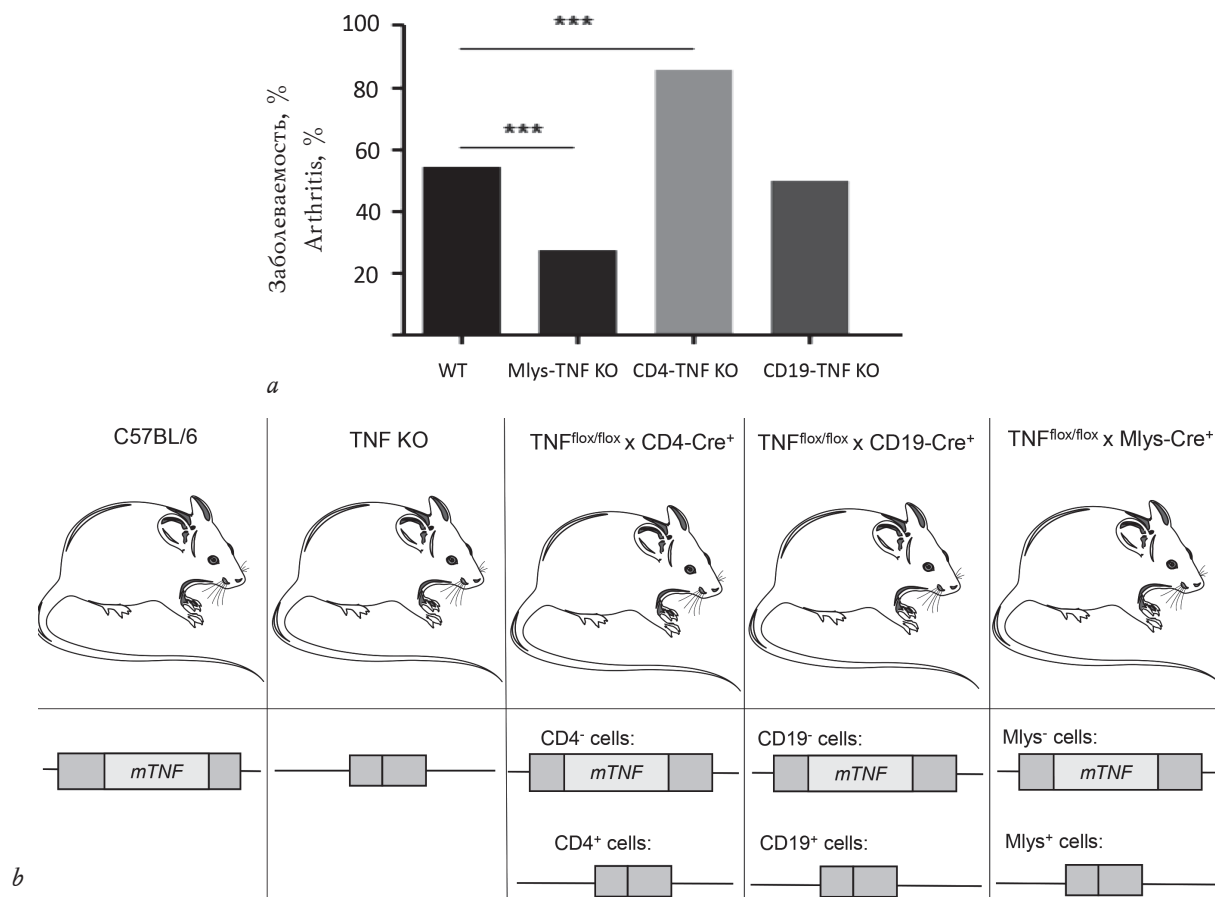


Рис. 1. Мыши с тканеспецифическим удалением TNF развивают воспаление различной степени тяжести в модели коллаген-индуцированного артрита: *a* – заболеваемость коллаген-индуцированным артритом. Мышей иммунизировали коллагеном в полном адьюванте Фрейнда с повышенным содержанием убитых микобактерий; *b* – схема получения панели мышей с полным и тканеспецифическими нокаутами гена *TNF*. Здесь и на рис. 3, 6, 7 данные представлены в виде среднего \pm SEM. *** $p < 0,001$

Fig. 1. Mice with tissue-specific inactivation of TNF develop inflammation of variable severity in the collagen-induced arthritis model: *a* – collagen-induced arthritis. The mice were immunized with collagen in complete Freund's adjuvant with the increased content of killed mycobacteria; *b* – schematic representation of a panel of mice with complete and tissue-specific knock-out of TNF. Here and in Fig. 3, 6 and 9, the data are presented as the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$

Для получения панели мутантов использовали мышей, у которых ген *TNF* был фланкирован loxP-сайтами. Под действием рекомбиназы Cre этот участок гена удаляется, в результате чего нарушается экспрессия цитокина. Мышей с флосированным геном *TNF* ($TNF^{flox/flox}$) скрещивали с мышами, экспрессирующими Cre-рекомбиназу под различными промоторами: цитомегаловирусный промотор (для получения мышей с полным нокаутом TNF), CD4 (нокаут TNF в Т-клетках), CD19 (нокаут TNF в В-клетках), Mlys (нокаут TNF в макрофагах и нейтрофилах).

Как можно объяснить парадоксальное, на первый взгляд, явление: при одном и том же заболевании один и тот же регуляторный белок, являющийся продуктом единственного гена, может выступать одновременно в роли как патогенного, так и защитного фактора в зависимости от того, какие клетки его продуцируют? Для TNF такая возможность обусловлена сложной биологией этого цитокина и дифференциальным использованием двух рецепторов TNF, которые отличаются по механизмам передачи внутриклеточного сигнала, а также по тканеспецифичности экспрессии.

Кроме того, TNF существует в двух формах – растворимой и мембранно-связанной – так как предшественник этого регуляторного цитокина представляет собой классический трансмембранный белок. Считается, что TNF рецептор 2 (TNFR2, p75) предпочтительно узнает именно трансмембранную форму TNF, которая отвечает только за некоторые иммунорегуляторные свойства TNF [8]. Мы предполагаем, что защитный эффект TNF, продуцируемого Т-клетками при артрите, связан, по крайней мере, частично с контролем патогенных популяций Th1 и Th17 CD4+ Т-клеток в периферических лимфоидных органах, а не в суставах, где развиваются патологические процессы [7].

Недавние работы [9] указывают на то, что передача сигнала от TNFR2 имеет отношение к функции Т-регуляторных клеток, на поверхности которых этот рецептор высоко экспрессирован. Передача сигнала от TNFR2 внутрь Т-регуляторной клетки контролирует экспрессию ключевых генов: *FoxP3*, *CD25*, *CTLA4* и некоторых других, что определяет как стабильность дифференцировки, так и функциональность супрессорного статуса этих клеток.

Нами были сконструированы мыши, гуманизированные по TNF и TNFR2, и предусмотрена возможность специфически удалять TNFR2 в Т-регуляторных клетках (рис. 2).

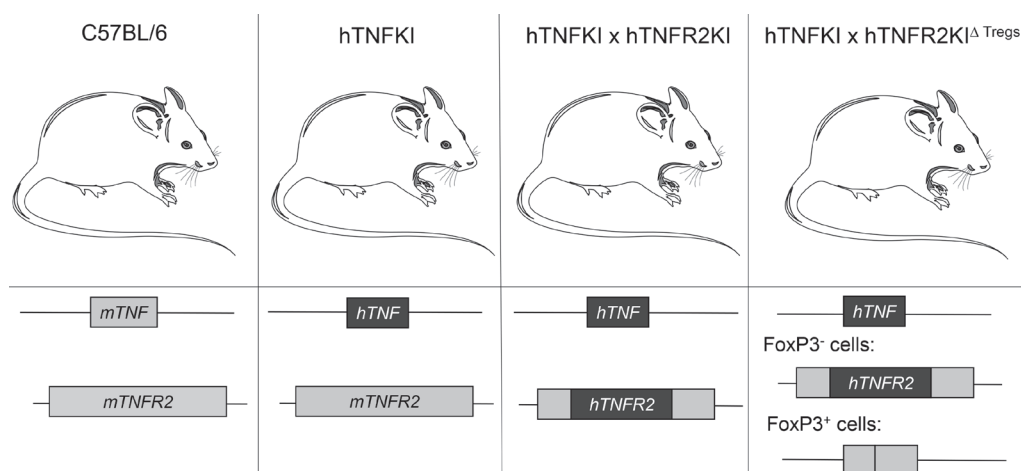


Рис. 2. Получение панели гуманизированных мышей по генам *bTNF* и *bTNFR2*, а также с тканеспецифическим нокаутом по *hTNFR2* в *FoxP3+* клетках

Fig. 2. Schematic representation of a panel of mice, humanized for *bTNF* and *bTNFR2* genes, as well as mice with tissue-specific knock-out of *hTNFR2* in *FoxP3+* cells

Оказалось, что у таких мышей аномально протекает ЭАЭ, что указывает на защитную роль передачи сигнала через TNFR2 именно в Т-регуляторных клетках (рис. 3) [10]. Мы также установили, что в ходе развития заболевания функциональность Т-регуляторных клеток из таких мышей снижена за счет нарушения передачи внутриклеточного сигнала от TNFR2. Поскольку в другой модели аутоиммунного заболевания защитная роль TNF (предположительно в мембранно-связанной форме) была приписана Т-лимфоцитам, а одной из «принимающих» клеточных популяций оказались Т-регуляторные клетки, в будущем мы планируем установить, какая субпопуляция Т-клеток и в каком органе или компартменте передает этот сигнал при ЭАЭ.

Отметим, что мыши, гуманизированные по TNF и его рецепторам, позволяют изучать эффекты лекарств, использующихся для антицитокиновой терапии в клинике. Из пяти широко применяемых

лекарств только одно – этанерцепт – блокирует TNF у мышей дикого типа. Важно отметить, что отличие этанерцепта от остальных блокаторов TNF состоит в его способности помимо TNF нейтрализовать растворимый LT альфа (LT α).

Напомним, что рекомбинантная форма LT α во всех экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* фактически эквивалентна TNF (включая способность вызывать геморрагический некроз опухолей у мышей). Однако до сих пор остается не до конца понятой физиологическая функция растворимой формы LT, LT α , которая передает сигналы через рецепторы TNF, а не через рецептор LT бета (LT β R). Долгое время считалось, что растворимой формы LT α в организме просто не существует, и LT α всегда связывается с LT β , переходит в мембранно-связанную форму и сигналит через LT β R.

Однако в нашей недавней работе была установлена уникальная для LT α функция в биологии

лимфоидных клеток врожденного иммунитета, состоящая в контроле продукции иммуноглобулина А (IgA) в кишечнике [4]. Интересно, что именно этанерцепт, блокирующий не только TNF, но и LT, является единственным блокатором TNF, который не оказывает терапевтического эффекта при болезни Крона, тяжелом воспалительном заболевании кишечника. Открытие невырожденной функ-

ции LTα в поддержании гомеостаза в кишечнике за счет контроля продукции IgA проливает свет на данный клинический парадокс, позволяя предположить, что неэффективность этанерцепта может быть прямо или косвенно связана со способностью этого лекарства нейтрализовать не только TNF, но и LTα. Без сомнения, описанная проблема заслуживает отдельного детального изучения.

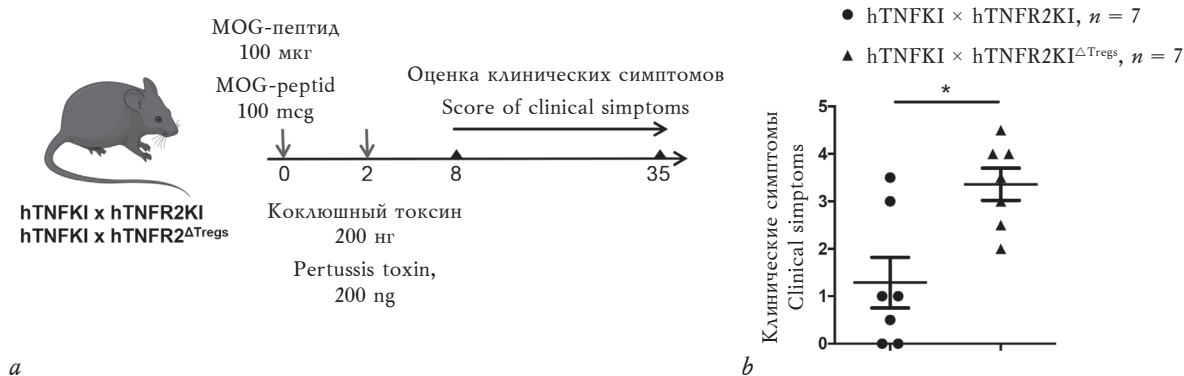


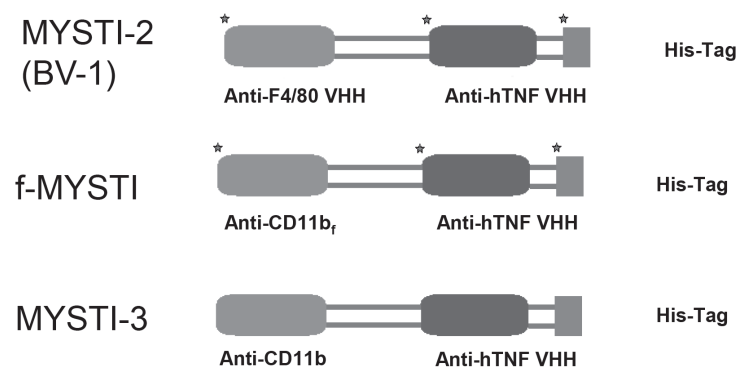
Рис. 3. Роль *TNF* и *TNFR2* в развитии энцефаломиелимита: *a* – индукция; *b* – развитие клинических симптомов у дважды гуманизированных мышей по генам *TNF* и *TNFR2* (hTNFKI × hTNFR2KI) и с делецией *TNFR2* в Treg-клетках (hTNFKI × hTNFR2^{ΔTregs}) [10]. **p* < 0,05

Fig. 3. Role of *TNF* and *TNFR2* in development of EAE: *a* – induction; *b* – development of clinical symptoms in doubly humanized *TNF/TNFR2* mice (hTNFKI x hTNFR2KI) and in mice with deletion of *TNFR2* in Treg-cells (hTNFKI x hTNFR2^{ΔTregs}) [10]. **p* < 0.05

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ БЛОКИРОВКА TNF, ПРОДУЦИРУЕМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ

Результаты генетических исследований в трех экспериментальных заболеваниях на мышах подсказали нам новую модальность антицитокиновой терапии, которая была впервые сформулирована 3 года назад [11]. В частности, нами были сконструированы и испытаны на гуманизированных мышах биспецифические антитела, узнающие цитокин человека (TNF), а также поверхностные маркеры на миелоидных клетках, что позволило избирательно блокировать биологическую актив-

ность TNF только из этого типа клеток. В качестве мишени биспецифических антител на поверхности миелоидных клеток мыши мы выбрали две поверхностные молекулы – F4/80 и CD11b [12] (рис. 4). Наша цель состояла в том, чтобы продвинуться в направлении создания лекарств, нейтрализующих патогенные функции TNF, но не затрагивающих главные защитные и гомеостатические свойства этого цитокина. Примером последних могут служить защитные функции TNF, продуцируемого Т-лимфоцитами в защите от микобактериальной инфекции [13], а также роль TNF, продуцируемого клетками гладкой мускулатуры в поддержании артериального давления [14].



His-Tag Рис. 4. Строение биспецифических антител, узнающих *bTNF* человека и поверхностные маркеры на миелоидных клетках мыши (F4/80 и CD11b), а также контрольной конструкции, которая узнает *TNF* человека, но не связывается с поверхностными молекулами макрофагов мыши [12]

Fig. 4. Structural scheme of bi-specific antibodies, recognizing *bTNF* and mouse myeloid cell surface molecules (F4/80 and CD11b), as well as the control construct, binding *bTNF*, but not any of the surface molecules of murine macrophages

Следующим шагом должна стать разработка прототипов лекарств, которые по тому же принципу могли бы взаимодействовать с маркерами миелоидных клеток человека [15]. К сожалению, наша фармацевтическая промышленность сконцентрирована на аналогах уже разработанных и одобренных зарубежных лекарств и пока не заинтересована в развитии проектов, которые неизбежно сопряжены с рисками.

СООТНЕСЕНИЕ ФУНКЦИЙ IL-6 С КОНКРЕТНЫМИ ВИДАМИ ЦИТОКИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК

Мы предположили, что связь функции цитокина с конкретным типом клетки-продуцента существует не только у TNF, но и у других плеiotропных цитокинов, например IL-6 [16]. По-

этому по аналогии с исследованиями функций TNF, производимого отдельными видами клеток, нами была создана панель мышей с кондиционными нокаутами IL-6 (рис. 5). Для создания панели мутантов использовали мышей, полученных из лаборатории Dr. Juan Hildago, у которых второй экзон гена *IL-6* был фланкирован loxP-сайтами. Под действием рекомбиназы Cre этот участок гена удаляется, в результате нарушается экспрессия цитокина. Мышей с флоскированным геном *IL-6* (*IL-6^{flox/flox}*) скрещивали с мышами, экспрессирующими рекомбиназу Cre под различными промоторами: промотор CMV (для получения мышей с полным нокаутом IL-6), CD11C (нокаут IL-6 в дендритных клетках), Mlys (нокаут IL-6 в макрофагах и нейтрофилах).

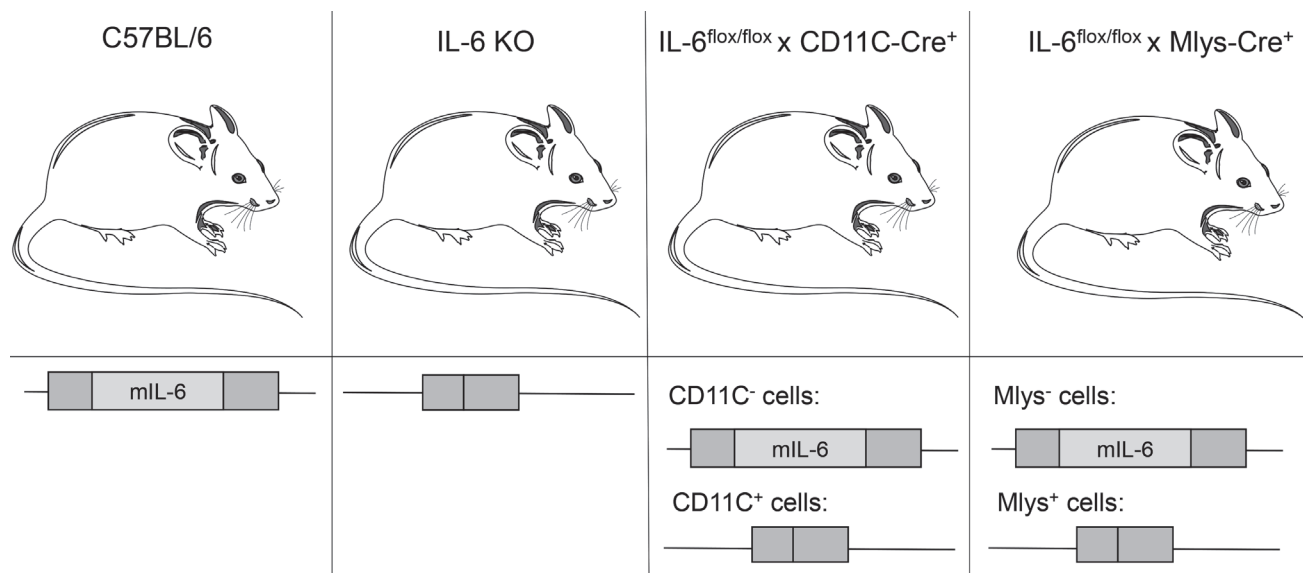


Рис. 5. Получение панели мышей с полным и тканеспецифическими нокаутами гена *IL-6* мыши
 Fig. 5. Schematic representation of a panel of mice with complete and tissue-specific knock-out of *IL-6*

Информативность исследований на этой панели продемонстрирована в модели острой аллергической астмы, при которой удаление IL-6 в макрофагах или дендритных клетках по-разному модулировало развитие заболевания, вызывая разные подтипы аллергической астмы (рис. 6) [17].

Кроме того, нами были сконструированы трансгенные мыши с регулируемой сверхэкспрессией IL-6 человека (рис. 7).

Интересно, что сверхпродукция IL-6 человека, способного связываться и передавать сигнал через мышинный IL-6R только миелоидными клетками, приводила к анемии и неонатальной

летальности мышей [18], в механизмах которой еще предстоит разобраться. По аналогии с концепцией, которую мы развиваем для TNF, нами начаты работы по получению однодоменных антител к IL-6 человека, которые можно будет использовать в биспецифических антителах, избирательно блокирующих биологическую активность IL-6 из выбранных клеточных источников.

Однако эти работы осложняются недавно открытыми особенностями биологии IL-6 [19, 20], которые состоят в том, что этот цитокин может секретироваться в комплексе со своим растворимым рецептором.

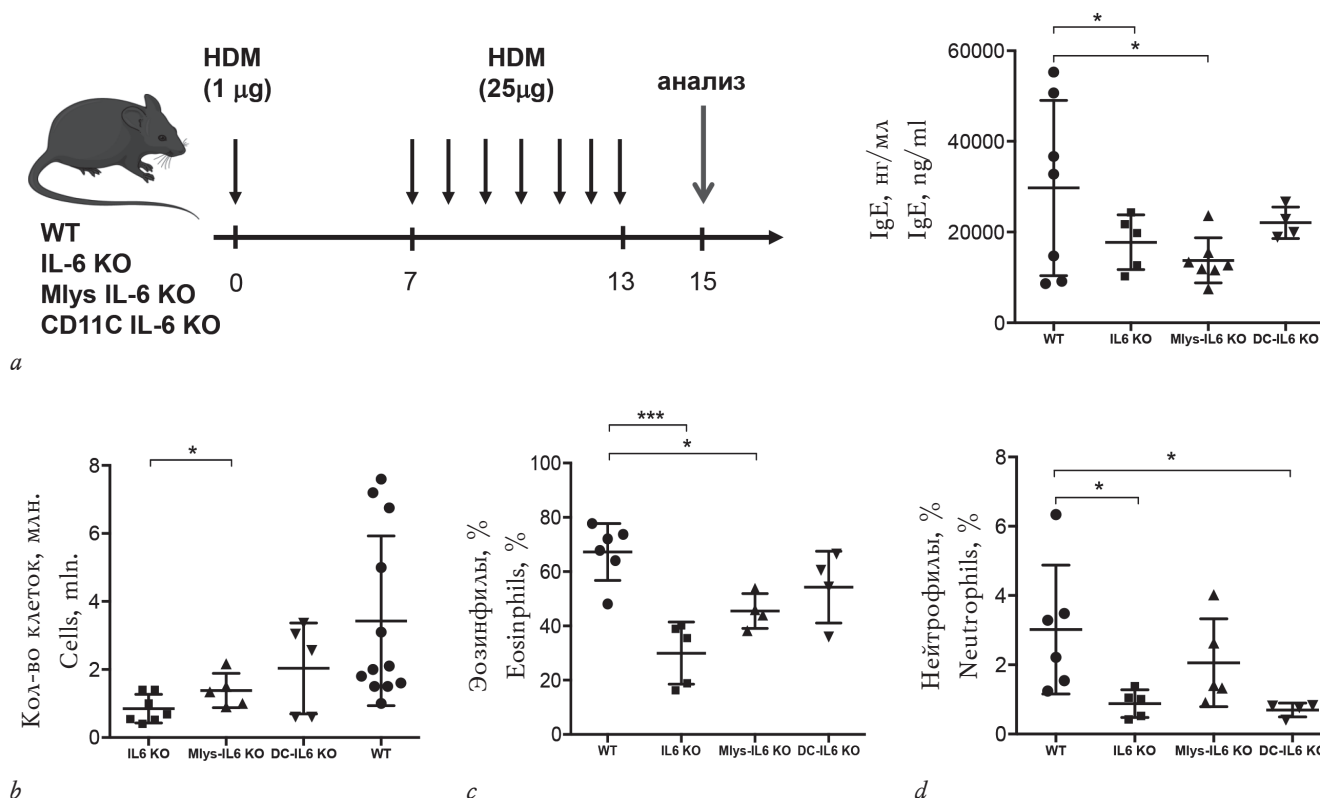


Рис. 6. Удаление *IL-6* в макрофагах или дендритных клетках по-разному модулирует развитие заболевания, вызывая разные подтипы аллергической астмы: *a* – эксперимент по индукции острой астмы у мышей посредством ежедневного интраназального введения 25 мкг экстракта пылевого клеща в течение 1 нед с сенсibilизирующим введением 1 мкг экстракта за 1 нед основного курса; *b* – концентрация IgE в сыворотке крови после индукции острой астмы у мышей, определенная методом иммуноферментного анализа, нг/мл; *c* – число клеток в бронхоальвеолярной жидкости у мышей при острой аллергической астме; *d* – доля эозинофилов и нейтрофилов от всех лейкоцитов бронхоальвеолярной жидкости после индукции острой астмы, определенная методом проточного цитофлуориметрического анализа, %. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Fig. 6. Deletion of *IL-6* in macrophages or dendritic cells modulates the development of asthma differently, resulting in two distinct allergic asthma subtypes: *a* – experiment with induction of acute asthma in mice by daily intranasal injection of 25 mcg house dust mite extract for 1 week, with sensitizing injection of 1 mcg extract 1 week before the course; *b* – IgE concentration in mouse blood serum after induction of acute asthma determined by ELISA, ng/ml; *c* – the number of cells in mouse epithelial lining fluid under acute allergic asthma; *d* – share of eosinophils and neutrophils from the total number of leukocytes in the epithelial lining fluid after induction of acute asthma, determined by flow cytometry, %. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многолетний цикл наших исследований продемонстрировал возможности технологий обратной генетики и биоинженерии антител в изучении фундаментальных проблем иммунологии. Известно, что практически для всех цитокинов были обнаружены невырожденные защитные и гомеостатические функции, выгодные для организма, и, вероятно, отобранные эволюцией. Наличие у цитокинов полезных регуляторных функций подразумевает, что системная антицитокиновая тера-

пия будет приводить к дефектам в работе иммунной системы, которые мы и наблюдаем у мышей с полными и некоторыми тканеспецифическими нокаутами. Таким образом, концепция системной терапии изначально подразумевает наличие опасных побочных эффектов. Мы предполагаем, что развитие специфической антицитокиновой терапии, преимущественно подавляющей патогенные свойства цитокина и не затрагивающей гомеостатические функции, является следующим шагом в разработке безопасных и эффективных лекарств.

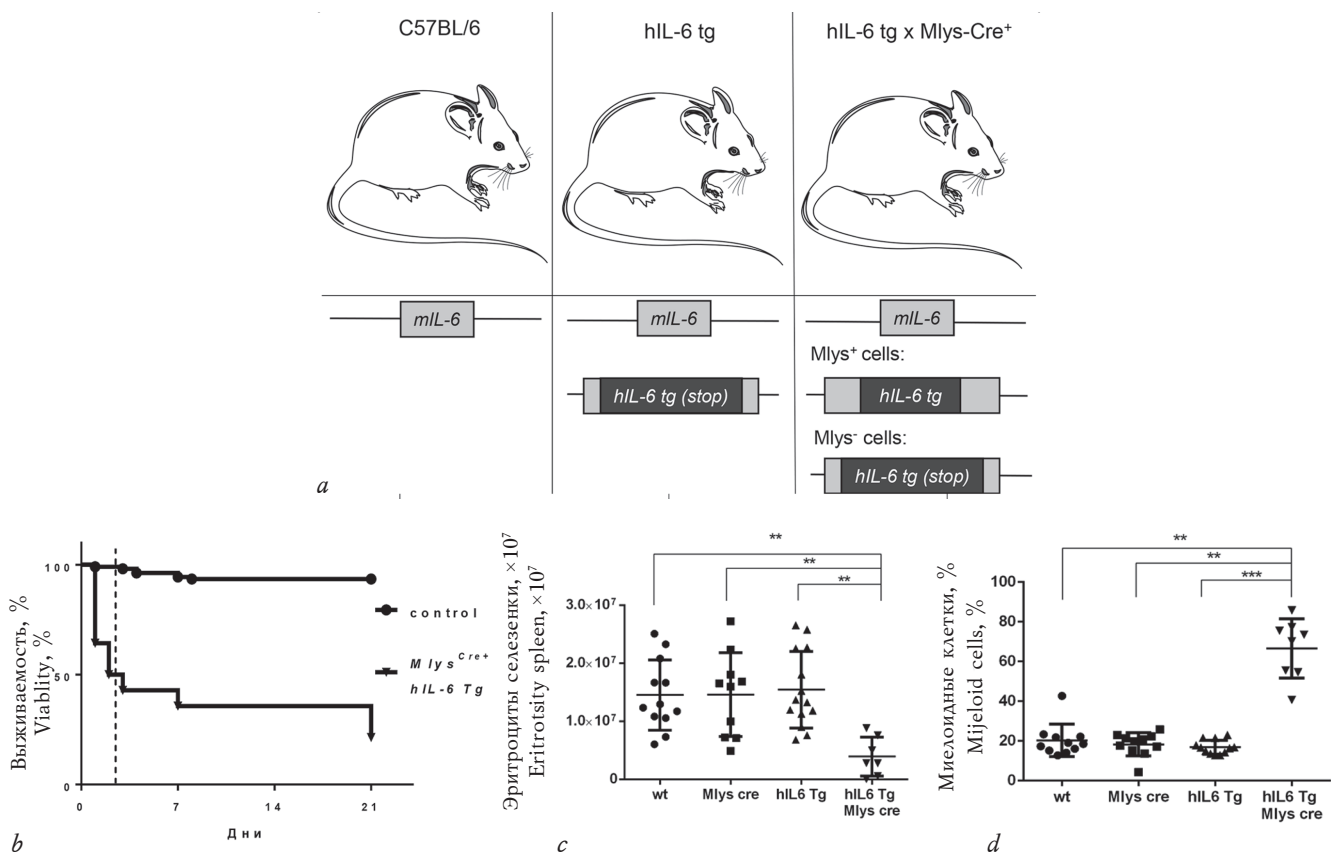


Рис. 7. Мыши со сверхэкспрессией IL-6 в миелоидных клетках погибают неонатально на фоне задержки роста, анемии и воспаления: *a* – скрещивание мышей MlysCre⁺ × hIL-6 Tg для получения мышей со сверхэкспрессией IL-6 человека в миелоидных клетках; *b* – кривая выживаемости, большая часть их потомства погибает в течение 1-й нед жизни; *c* – абсолютное число эритроцитов в селезенке трехдневных мышей MlysCre⁺ hIL-6 Tg значительно снижено по сравнению с однопометными мышами контрольных генотипов; *d* – доля миелоидных клеток CD45+CD11b⁺ в селезенке мышей MlysCre⁺ hIL-6 Tg снижена по сравнению с однопометными мышами контрольных генотипов. **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001

Fig. 7. Mice with overexpression of IL-6 in myeloid cells die neonatally due to growth arrest, anemia and systemic inflammation: *a* – crossing of MlysCre⁺ × hIL-6 Tg mice to obtain mice with overexpression of human IL-6 in myeloid cells; *b* – survival curve; most part of the offspring die during the first week after birth; *c* – the absolute number of erythrocytes in the spleen of 3 day-old MlysCre⁺ hIL-6 Tg mice is significantly lower than in the control littermates; *d* – share of myeloid CD45+CD11b⁺ cells in the spleen of MlysCre⁺ hIL-6 Tg mice is lower than in the control littermates. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001

Для двух важнейших провоспалительных цитокинов – TNF и IL-6 – возможность для разработки специфических блокаторов предусмотрена особенностями системы передачи сигнала. Кроме того, наше исследование подчеркивает информативность изучения экспериментальных модельных заболеваний на мышах (в том числе на гуманизированных мышах) как для установления молекулярных механизмов патологий, так и для доклинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Maini R.N., Elliott M., Brennan F.M., Williams R.O., Feldmann M. Targeting TNF alpha for the therapy of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1994; 12 (Suppl. 11): 63–66.

2. Tumanov A., Kuprash D., Lagarkova M., Grivennikov S., Abe K., Shakhov A., Drutskaya L., Stewart C., Chervonovsky A., Nedospasov S. Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues. *Immunity.* 2002; 17 (3): 239–250. DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00397-7.

3. Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Kruglov A.A., Marakusha B.I., Shakhov A.N., Murakami T., Drutskaya L.N., Forster I., Clausen B.E. et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity.* 2005; 22 (1): 93–104. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.11.016.

4. Kruglov A.A., Grivennikov S.I., Kuprash D.V., Winsauer C., Prepens S., Seleznik G.M., Eberl G., Littman D.R., Heikenthal M., Tumanov A.V. et al. Nonredundant func-

- tion of soluble LTalpha3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science*. 2013; 342 (6163): 1243–1246. DOI: 10.1126/science.1243364.
5. Alimzhanov M.B., Kuprash D.V., Kosco-Vilbois M.H., Luz A., Turetskaya R.L., Tarakhovsky A., Rajewsky K., Nedospasov S.A., Pfeffer K. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94 (17): 9302–9307.
 6. Kruglov A.A., Lampropoulou V., Fillatreau S., Nedospasov S.A. Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells. *Journal of Immunology*. 2011; 187 (11): 5660–5670. DOI: 10.4049/jimmunol.1100663.
 7. Drutskaya M.S., Efimov G.A., Astrakhantseva I.V., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. Making anti-cytokine therapy more selective: Studies in mice. *Cytokine*. 2018; 101: 33–38. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.08.022.
 8. Grell M., Douni E., Wajant H., Lohden M., Claus M., Maxeiner B., Georgopoulos S., Lesslauer W., Kollias G., Pfizenmaier K. et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995; 83 (5): 793–802.
 9. Chen X., Wu X., Zhou Q., Howard O.M., Netea M.G., Oppenheim J.J. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell phenotype in the inflammatory environment. *Journal of Immunology*. 2013; 190 (3): 1076–1084. DOI: 10.4049/jimmunol.1202659.
 10. Atretkhany K.-S.N., Mufazalov I.A., Dunst J., Kuchmiy A., Gogoleva V.S., Andruszewski D., Drutskaya M.S., Faustman D.L., Schwabenland M., Prinz M. et al. Intrinsic TNFR2 signaling in T regulatory cells provides protection in CNS autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018; 115 (51): 13051–13056. DOI: 10.1073/pnas.1807499115.
 11. Efimov G.A., Kruglov A.A., Khlopchatnikova Z.V., Rozov F.N., Mokhonov V.V., Rose-John S., Scheller J., Gordon S., Stacey M., Drutskaya M.S. et al. Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113 (11): 3006–3011. DOI: 10.1073/pnas.1520175113.
 12. Nosenko M.A., Atretkhany K.N., Mokhonov V.V., Efimov G.A., Kruglov A.A., Tillib S.V., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. VHH-Based Bispecific Antibodies Targeting Cytokine Production. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 1073. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01073.
 13. Allie N., Grivennikov S.I., Keeton R., Hsu N.J., Bourigault M.L., Court N., Fremond C., Yermeev V., Shebzukhov Y., Ryffel B. et al. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Sci. Rep.* 2013; 3: 1809. DOI: 10.1038/srep01809.
 14. Kroetsch J.T., Levy A.S., Zhang H., Aschar-Sobbi R., Lidington D., Offermanns S., Nedospasov S.A., Backx P.H., Heximer S.P., Bolz S.S. Constitutive smooth muscle tumour necrosis factor regulates microvascular myogenic responsiveness and systemic blood pressure. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14805. DOI: 10.1038/ncomms14805.
 15. Drutskaya M.S., Efimov G.A., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. Can we design a better anti-cytokine therapy? *J. Leukoc. Biol.* 2017; 102 (3): 783–790. DOI: 10.1189/jlb.3MA0117-025R.
 16. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014; 6 (10): a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
 17. Gubernatorova G.O., Gorshkova E.A., Namakanova O.A., Zvartsev R.V., Hidalgo J., Drutskaya M.S., Tumanov A.V., Nedospasov S.A. Non-redundant functions of IL-6 produced by macrophages and dendritic cells in allergic airway inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 2718. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02718.
 18. Зварцев Р.В., Коршунова Д.С., Горшкова Е.А., Носенко М.А., Корнеев К.В., Максименко О.Г., Коробко И.В., Купраш Д.В., Друцкая М.С., Недоспасов С.А., Дейкин А.В. Неонатальная смертность и воспалительный фенотип у новых трансгенных мышей со сверхэкспрессией интерлейкина-6 человека в миелоидных клетках. *Доклады Академии наук*. 2018; 483 (4): 344–347. [Zvartsev R.V., Korshunova D.S., Gorshkova E.A., Nosenko M.A., Korneev K.V., Maximenko O.G., Korobko I.V., Kuprash D.V., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Deikin A.V. Neonatal lethality and inflammatory phenotype of new transgenic mice with overexpression of human interleukin-6 in myeloid cells. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018; 483 (1): 344–347 (in Russ.)]. DOI: 10.1134/S1607672918060157.
 19. Heink S., Yogev N., Garbers C., Herwerth M., Aly L., Gasperi C., Husterer V., Croxford A.L., Moller-Hackbarth K., Bartsch H.S. et al. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunology*. 2017; 18 (1): 74–85. DOI: 10.1038/ni.3632.
 20. Rose-John S., Winthrop K., Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nature Reviews. Rheumatology*. 2017; 13 (7): 399–409. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.83.

Вклад авторов

Друцкая М.С., Губернаторова Е.О., Горшкова Е.А., Атретханы К.-С.Н., Носенко М.А., Гоголева В.С., Намаканова О.А., Зварцев Р.В., Круглов А.А. – проведение исследова-

Authors contribution

Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Atretkhany K.-S.N., Nosenko M.A., Gogoleva V.S., Namakanova O.A., Zvartsev R.V., and Kruglov A.A. performed

дований, анализ и интерпретация данных. Друцкая М.С., Губернаторова Е.О., Горшкова Е.А., Атреткханы К.-С.Н., Носенко М.А., Круглов А.А., Недоспасов С.А. – разработка концепции и дизайна исследования, обоснование цели, основных положений и заключения рукописи. Друцкая М.С., Губернаторова Е.О. – проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации.

experiments, analyzed data and interpreted the results. Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Atretkhany K.-S.N., Nosenko M.A., Kruglov A.A., and Nedospasov S.A. worked on the concept and designed the experiments, provided experimental tools and background, summarized the experimental data for the manuscript. Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O., and Nedospasov S.A. critically read and finalized the manuscript.

Сведения об авторах

Друцкая Марина Сергеевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, ИМБ РАН; вед. науч. сотрудник, кафедра иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Губернаторова Екатерина Олеговна, мл. науч. сотрудник, ИМБ РАН; аспирант, кафедра иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Горшкова Екатерина Александровна, лаборант-исследователь, ИМБ РАН; аспирант, кафедра иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Атреткханы Камар-Сулу Нияз кызы, мл. науч. сотрудник, ИМБ РАН; аспирант, кафедра иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Носенко Максим Андреевич, мл. науч. сотрудник, ИМБ РАН; аспирант, кафедра иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Гоголева Виолетта Сергеевна, лаборант-исследователь, ИМБ РАН; студент, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Намаканова Ольга Александровна, лаборант-исследователь, ИМБ РАН; студент, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Зварцев Руслан Валерьевич, мл. науч. сотрудник, ИМБ РАН, г. Москва.

Круглов Андрей Алексеевич, канд. биол. наук, ст. инженер-исследователь, ИМБ РАН; ст. науч. сотрудник, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Недоспасов Сергей Артурович, д-р биол. наук, академик РАН, гл. науч. сотрудник, зав. лабораторией молекулярных механизмов иммунитета, ИМБ РАН; зав. кафедрой иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

✉ Друцкая Марина Сергеевна, e-mail: marinadru@gmail.com.

Authors information

Drutskaya Marina S., PhD, Senior Researcher, EIMB RAS; Senior Researcher, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Gubernatorova Ekaterina O., Junior Researcher, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Gorshkova Ekaterina A., Research Associate, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Atretkhany Kamar-Sulu N., Junior Researcher, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Nosenko Maxim A., Junior Researcher, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Gogoleva Violetta S., Research Associate, EIMB RAS; Junior Researcher, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Namakanova Olga A., Research Associate, EIMB RAS; Junior Researcher, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Zvartsev Ruslan V., Junior Researcher, EIMB RAS, Moscow, the Russian Federation.

Kruglov Andrey A., PhD, Senior Researcher Engineer, EIMB RAS; Senior Researcher, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Nedospasov Sergei A., DBSc, RAS, Leading Researcher, Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, EIMB RAS; Head of the Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

✉ Drutskaya Marina S., e-mail: marinadru@gmail.com.

Поступила в редакцию 08.11.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Received 08.11.2018
Accepted 17.12.2018