

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулёза»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Пустыльников Сергей Владиславович

**ЭНДОЦИТОЗ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ МАКРОФАГОВ В
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ВИЧ ИНФЕКЦИИ И
ТУБЕРКУЛЕЗА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДЕКСТРАНОВ**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Шварц Яков Шмульевич

Иркутск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Биологические свойства декстрана.....	9
1.1.1. Виды эндоцитоза декстрана.....	10
1.1.2. Декстран-связывающие рецепторы	13
1.1.3. Фармакокинетика декстрана.....	15
1.2. Роль декстран-связывающих рецепторов при инфекциях.....	17
1.2.1. Роль DC-SIGN и MR в патогенезе ВИЧ инфекции.....	20
1.2.2. Роль DC-SIGN и MR при туберкулезе	21
1.2.3. Эффекты декстрана и его производных в инфекционных моделях	24
1.2.4. Влияние декстранов на эндоцитоз и цитокиновый ответ на патогены: задачи ..	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	28
2.1. Дизайн исследований	28
2.2. Используемые в работе культуры клеток, животные и патогены.....	33
2.3. Используемые в работе реагенты	33
2.4. Методы работы с культурами клеток	34
2.4.1. Культивирование клеток В-ТНР-1 и В-ТНР-1/DC-SIGN	34
2.4.2. Получение мононуклеарных клеток периферической крови и макрофагов	35
2.5. Методы работы с экспериментальными животными.....	35
2.6. Выделение РНК и получение кДНК	36
2.7. ПЦР в реальном времени	37
2.8. Иммуноферментный анализ	38
2.9. Статистическая обработка	38
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	40
3.1. Влияние декстранов на связывание DC-SIGN с остатками маннозы.....	40
3.2. Влияние декстранов на DC-SIGN-зависимый эндоцитоз ВИЧ.....	44
3.3. Влияние декстранов на цитокиновый ответ на микобактерии <i>in vitro</i>	48
3.3.1. Влияние декстранов на цитокиновый ответ макрофагов на <i>M. tuberculosis</i>	48

3.3.2. Влияние декстранов на цитокиновый ответ макрофагов на ManLAM	51
3.3.3. Влияние декстранов на цитокиновый ответ макрофагов на <i>M. bovis</i> BCG	54
3.4. Влияние декстранов на экспрессию генов цитокинов макрофагами	57
3.5. Влияние декстрана на цитокиновый ответ на микобактерии <i>in vivo</i>	58
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	62
4.1. Ингибирование DC-SIGN и DC-SIGN-зависимого эндоцитоза декстранами	63
4.2. Влияние декстранов на цитокиновый ответ на микобактерии <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	68
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	76
ВЫВОДЫ	78
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	79
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	81

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

ВИЧ инфекция и туберкулез находятся в ряду основных нерешенных проблем современной медицины. Высокая заболеваемость, смертность и трудности их лечения приводят к тому, что эти заболевания наносят очень высокий медико-социальный и экономический ущерб в России; особенно опасно их сочетание [1-3]. В мире каждое из этих заболеваний ежегодно уносит жизни более миллиона человек, каждое требует продолжительного, а в случае ВИЧ пожизненного лечения. Инфекции действуют синергично, ослабляя иммунные реакции [3] и осложняя лечение, которое включает по несколько препаратов как для ВИЧ, так и для туберкулеза [4]. Разработка эффективных средств профилактики и терапии ВИЧ инфекции и туберкулеза должна базироваться на исследовании молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в основе этих заболеваний.

Общим звеном в патогенезе множества инфекций, включая ВИЧ инфекцию и туберкулез, является взаимодействие патогенов с лектиноподобными рецепторами C-типа (CLR), находящимися на плазматической мембране макрофагов и других иммунокомпетентных клеток. Данные рецепторы обеспечивают связывание, захват и распознавание патогенов через гликозилированные структуры; при различных инфекциях эти взаимодействия могут способствовать как разрешению, так и развитию патологического процесса [5, 6]. Характерными представителями CLR являются маннозный рецептор (MP) и рецептор DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin).

Одним из подходов к регулированию/вмешательству в отношения патоген-CLR является использование лигандов, конкурирующих с возбудителем за рецептор. Классические лиганды, активно связывающиеся с MP и DC-SIGN [7], безопасные и давно применяемые в медицине, биологии и пищевой промышленности — это декстраны — полисахариды глюкозы, обладающие, как считается, биологически инертными свойствами. Тем не менее, ни параметры связывания декстранов с CLR, ни способность декстранов вмешиваться во взаимодействие возбудителей с этими рецепторами в литературе до сих пор не охарактеризованы, а вопрос об иммунобиологической инертности декстранов целенаправленно никогда не изучался.

DC-SIGN связывают гликопротеины разнообразных микроорганизмов, включая бактерии (в том числе микобактерии), грибы и простейшие, обеспечивая их захват, внутриклеточный процессинг и презентацию антигенов, однако в отношении эндоцитоза наиболее исследовано значение этих рецепторов для нескольких вирусов, в первую очередь

ВИЧ [6]. При ВИЧ инфекции блокада входа вирионов в клетки – это подход, который уже применяется в антиретровирусной терапии [7]. Для ингибирования входа ВИЧ через DC-SIGN предлагают использовать полисахариды [8, 9], однако декстраны – вполне перспективные конкурентные ингибиторы, с этой целью до сих пор не применялись и их конкурентный потенциал экспериментально не оценивался. Взаимодействие декстрана с CLR приводит к внутриклеточному захвату самого полисахарида, при этом декстраны с низкой молекулярной массой не активируют эндоцитоз [8]. В связи с этим в контексте поиска ингибиторов DC-SIGN-зависимого эндоцитоза не менее актуально исследование олигодекстрана.

Рецепторы макрофагов, опосредующие захват микобактерий туберкулеза, включают не только лектины С-типа, включая MP и DC-SIGN, но и скэвенджер рецепторы (SR-A, MARCO), а также рецепторы системы комплемента (CR1, CR3 and CR4) [9, 10]. Учитывая множественность путей поглощения микобактерий, наиболее важным аспектом активации CLR при взаимодействии с возбудителями туберкулеза является их вклад в поляризацию макрофагов, так как при микобактериальной инфекции про- или противовоспалительная поляризация этих клеток определяет про-Th1 или -Th2 характер иммунного ответа и, в конечном счете, течение и исход патологического процесса [11]. Альтернативно активированные макрофаги и альвеолярные макрофаги экспрессируют MP и DC-SIGN [12, 13], но данные о роли этих рецепторов в формировании иммунофенотипа макрофагов противоречивы. Часть их свидетельствует об анти-, а часть — о провоспалительных эффектах. Например, по одним данным взаимодействие липоарабиноманнана микобактерий с DC-SIGN снижает экспрессию и провоспалительные эффекты активации TLR, стимулируя продукцию ИЛ-10, цитокина ограничивающего активацию Th1 ответа [14]. По другим данным DC-SIGN-сигналирование, напротив, может стимулировать про-Th1 ответ [15]. Одни лиганды MP способны индуцировать выработку ИЛ-10 и подавлять активацию Th1 ответа, в то время как другие не меняют иммунофенотип клеток [16]. Не исключено, что полисахариды, способные вмешиваться в отношения патоген-CLR, могут оказывать влияние на патоген-индуцированную поляризацию макрофагов. Поэтому исследование способности декстранов — известных лигандов MP и DC-SIGN, вмешиваться во взаимодействие *M. tuberculosis*-макрофаг и менять продукцию ключевых для исхода туберкулеза цитокинов, таких как ИФН- γ и ИЛ-10, крайне актуально [17, 18].

Цель исследования

Установить механизмы влияния декстранов на эндоцитоз и формирование воспалительного ответа при взаимодействии патогенов с иммунными клетками в моделях ВИЧ инфекции и туберкулеза

Задачи исследования

1. Исследовать воздействие декстранов на связывание DC-SIGN с маннозилированным белком в бесклеточной системе
2. Оценить влияние декстранов на DC-SIGN-зависимый эндоцитоз ВИЧ
3. Определить воздействие декстранов на экспрессию, продукцию и соотношение ИФН- γ и ИЛ-10 при заражении культуры макрофагов микобактериями туберкулеза
4. В модели микобактериальной инфекции *in vivo* оценить влияние декстрана на продукцию ИФН- γ и ИЛ-10 в легких у мышей

Научная новизна работы

В работе впервые показана принципиальная возможность влияния на процесс эндоцитоза и механизмы иммунного распознавания патогенов при помощи декстранов. Впервые установлен рецептор-зависимый механизм действия декстрана и олигодекстрана на эндоцитоз; показано, что декстраны снижают внутриклеточный захват патогена и влияют на провоспалительный ответ инфицированных макрофагов. В частности, показано, что декстраны блокируют связывание маннозилированного белка с DC-SIGN в бесклеточной системе, а в системе *in vitro* блокируют эндоцитоз ВИЧ-1 через рецептор DC-SIGN.

В работе впервые обнаружено увеличение соотношения ИФН- γ /ИЛ-10, положительно коррелирующего как с выраженностью провоспалительного/про-Th1 ответа, так и с положительной динамикой в лечении туберкулеза, при воздействии декстранов на макрофаги, зараженные *M. tuberculosis*. Аналогичное, и еще более выраженное увеличение соотношения ИФН- γ /ИЛ-10 показано в легких экспериментальных животных после введения *M. tuberculosis*. В моделях туберкулеза *in vitro* и *in vivo* численный анализ изменений соотношения ИФН- γ /ИЛ-10 в свете данных о его характерных значениях свидетельствует о декстран-индуцированном переключении иммунного ответа с противовоспалительного на провоспалительный (про-Th1) ответ (значения более 2,0) при воздействии декстрана.

На основе полученных результатов разработана концептуальная схема влияния декстранов на патогенетические процессы при инфекциях.

Теоретическая значимость работы

Данные, полученные в рамках работы, позволяют заключить, что при инфекциях декстраны не являются биологически инертными молекулами и могут влиять на реализацию патогенетических механизмов: (1) ингибировать вход патогенов в иммунные клетки через декстран-связывающие рецепторы, и (2) модулировать иммунный ответ на патогены.

Выявленные ингибирующие эффекты декстрана и олигодекстрана в отношении рецептора DC-SIGN показали, что линейные полимеры глюкозы и их фрагменты способны существенно влиять на рецептор-зависимый захват патогена. В моделях туберкулеза *in vitro* и *in vivo* установлено, что в ходе инфицирования макрофагов декстран способен изменять продукцию и повышать соотношение концентраций ИФН- γ /ИЛ-10. Обнаруженное CLR-опосредованное декстран-зависимое смещение цитокинового ответа на возбудитель в сторону про-Th1 показало, что декстраны могут модулировать патоген-индуцированный иммунный ответ в направлении благоприятном для борьбы с микобактериальной инфекцией.

Практическая значимость работы

Новые данные о рецептор-специфичном ингибирующем действии декстрана и олигодекстрана могут быть использованы в исследованиях по разработке новых биомедицинских продуктов на основе декстрана и олигодекстрана. Установленная в работе способность декстранов усиливать про-Th1 ответ на микобактерии туберкулеза позволяет исследовать их как перспективный иммуноадьювантный компонент для создания противотуберкулезных вакцин.

Методология и методы исследования

Методология работы основана на поэтапном исследовании эффектов декстранов *in vitro* в бесклеточных системах, далее — в системах с культурами клеток и затем — на экспериментальных животных. Сначала изучали взаимодействие декстранов с рецептором DC-SIGN в бесклеточной системе и подтвердили лиганд-рецепторные отношения между ними. Далее исследовали влияние декстранов на DC-SIGN-опосредованный эндоцитоз ВИЧ, и на *M. tuberculosis*-индуцированную продукцию цитокинов в культуре клеток. Затем оценивали влияние декстранов на *M. tuberculosis*-индуцированный иммунный ответ в модели *in vivo*.

Методы работы с клетками включали: культивирование клеточных линий В-ТНР-1 и В-ТНР-1/DC-SIGN, выделение мононуклеаров периферической крови человека и получение культуры макрофагов. Эксперименты с патогенами проводили в соответствии с инструкциями по работе с патогенами III-IV группы (микобактерии, псевдовиром ВИЧ). Методы работы с животными: интраназальное введение, получение плазмы крови и гомогенатов легких. Определение исследуемых параметров проводили, используя: поверхностный плазмонный резонанс, иммуноферментный анализ и ОТ-ПЦР в реальном времени. Для статистической обработки данных использовали Т-тест Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни.

Положения, выносимые на защиту

1. Декстран и олигодекстран ингибируют рецептор DC-SIGN и участвуют в блокаде DC-SIGN-зависимого эндоцитоза ВИЧ.

2. Инкубация с декстраном смещает функциональный фенотип *M. tuberculosis*-инфицированных макрофагов человека в провоспалительную сторону, повышая соотношение цитокинов ИФН- γ /ИЛ-10; выраженное повышение индекса ИФН- γ /ИЛ-10 под воздействием декстрана происходит в легких *M. tuberculosis*-инфицированных мышей.

Степень достоверности работы

Достоверность работы подтверждается применением апробированных и стандартизованных методов исследования, достаточным объемом полученного фактического материала, использованием современных методов обработки информации и статистического анализа, и соответствием результатов, полученных в бесклеточных и клеточных моделях.

Апробация результатов работы

Результаты и содержание работы доложены и обсуждены на девяти конференциях, включая: третью международную телеконференцию "Фундаментальные науки и практика" (Томск, 2010); Annual Meeting of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2012 (Geneva, Switzerland, 2012); вторую российско-немецкую неделю молодого ученого "Здоровье и общество" (Екатеринбург, 2012); 2012 Annual Meeting of the American College of Allergy, Asthma and Immunology (Anaheim, USA, 2012); 43rd Union Conference on lung health (Kuala Lumpur, Malaysia, 2013); European Academy of Allergy and Clinical Immunology and World Allergy Organisation Congress, 2013 (Milan, Italy, 2013); конференцию объединения специалистов по работе с лабораторными животными 2013 (Новосибирск, 2013); American Society for Microbiology 114th General Meeting (Boston, USA, 2014); 2014 International Symposium on Molecular Medicine and Infectious Disease (Philadelphia, USA, 2014).

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертационных работ.

Личный вклад автора

Экспериментальная работа проведена автором лично. Эксперименты задачи 1 выполнены совместно с Ванессой Порколаб и Франком Фиесчи (разрешение на использование данных в работе получено). Все таблицы и рисунки в работе подготовлены лично автором.

Структура и объем работы

Работа состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка литературы; включает 25 рисунков, 5 таблиц и 303 библиографические ссылки. Объем: 108 страниц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биологические свойства декстрана

Декстран — полимер глюкозы с преобладанием α -1,6-связанных остатков, как правило, линейный (Рисунок 1). Декстран входит в состав вакцин, косметических средств, продуктов питания и лекарств. Кроме того, это один из наиболее широко используемых заменителей плазмы крови. Молекулы на основе декстрана (например, флуоресцентные маркеры) играют важную роль в биомедицинских исследованиях. Свойства декстрана включают: регулируемые размер молекул и вязкость; химическую стабильность и простоту модификации; способность взаимодействовать с определенными типами клеток и рецепторов; относительная биологическая инертность и биосовместимость. Однако, декстран-связывающие рецепторы — это одновременно рецепторы многих патогенов. Действие декстрана при инфекционных процессах практически не исследовано.

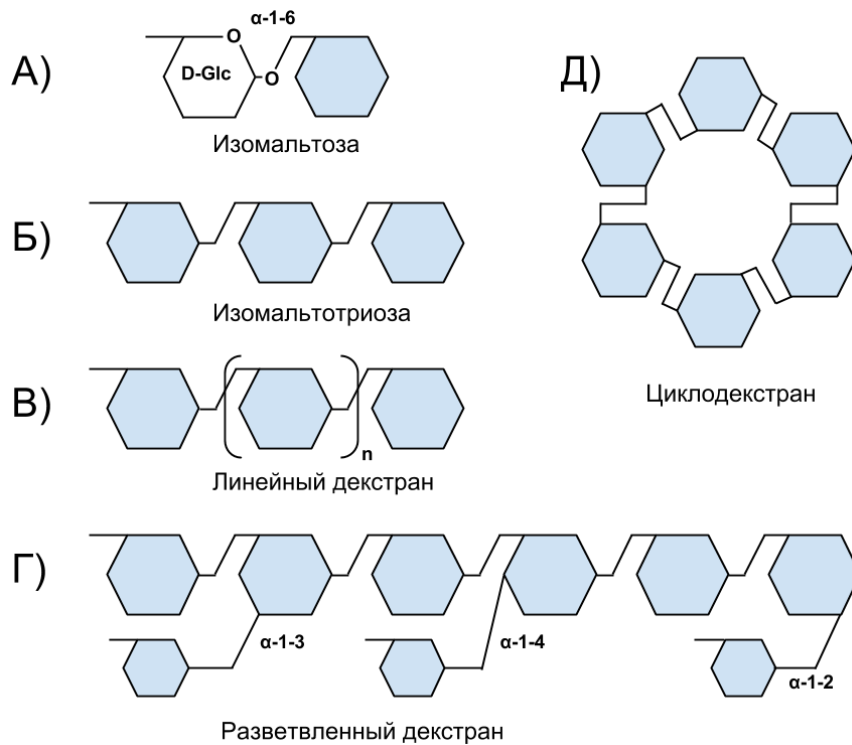


Рисунок 1. Типы α -1,6-связанных соединений глюкозы. А) Изомальтоза (две молекулы глюкозы с α -1,6 связью). Б) Изомальтотриоза. В) Линейный декстран. Г) Разветвленный декстран (схематично). Д) α -циклодекстран

В подробных обзорах для медицинских работников [19], биохимиков, фармацевтов, специалистов в области биотехнологии [20-22] рассказывается о свойствах декстрана как лекарства, способах получения и применения декстрана. Тем не менее, обзору способов клеточного захвата не посвящено ни одной работы.

Декстран — смесь линейных гидрофильных, незаряженных молекул разной длины и молекулярной массы, состоящих из остатков α -1,6-связанной глюкозы. От концентрации декстрана в растворах зависят их вязкость и плотность. Декстран практически не имеет токсических, пирогенных и аллергических эффектов, скорость его выведения из организма зависит от молекулярной массы (может находиться в крови несколько дней), он термически и химически стабилен. Все это позволяет применять декстран в биологических средах организма с различными целями. При этом он легко образует различные производные, подвергается стерилизации, при массовом производстве имеет невысокую стоимость [23, 24].

Аллергический ответ на декстран довольно редок, но механизм его возникновения общий для тимус-независимых антигенов второй группы [25, 26]. К иммуномодулирующим эффектам декстрана у человека можно отнести снижение фагоцитоза макрофагами, снижение пролиферации лимфоцитов; при этом декстран безопасен в случае применения крайне высоких концентраций: более 300 мл препарата с концентрацией 32% вводили интраперитонеально [27, 28]. В концентрациях до 17,5% декстран повышает жизнеспособность эндотелиоцитов и снижает способность к адгезии эндотелиоцитов и нейтрофилов человека [29]. При этом декстран повышает метаболическую активность нейтрофилов [30]. В культуре незрелых дендритных клеток человека, полученных из моноцитов, добавление декстрана не влияет существенно на концентрации продуцируемых ими цитокинов [16, 31].

Биологические эффекты декстрана игнорируются во многих прикладных разработках: эта молекула используется в качестве нефункционального биосовместимого остова, сопряженного с функциональными группами (флуоресцентными красителями, лекарственными препаратами, заряженными или гидрофобными группами). Тем не менее, декстран-связывающие рецепторы, принадлежащие к семейству лектинов С-типа: маннозный рецептор (MP), DC-SIGN, L-SIGN (гомолог DC-SIGN печени и лимфатического эндотелия) и лангерин — важны при инфекциях. По литературным данным [14] эти рецепторы участвуют в иммунном распознавании и захвате многочисленных патогенов, таких как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и микобактерии туберкулеза (МБТ).

1.1.1. Виды эндоцитоза декстрана

Декстраны активно захватываются некоторыми типами клеток. Клинические декстраны с молекулярными массами 35-80,000 захватываются клетками более активно, по сравнению с

олигодекстранами [8]. Поэтому использование декстранов и олигодекстранов может быть разным: большие молекулы (способные циркулировать в кровотоке от часов до нескольких дней) обеспечивают пролонгированное действие и доставку в клетки. Более мелкие молекулы могут скорее являться ингибиторами рецептор-зависимого эндоцитоза, связываясь с рецепторами (собственные данные), но не активируя эндоцитоз [8].

Декстран связывается и захватывается макрофагами, ДК и другими клетками с помощью специфических рецепторов: МР, рецепторов семейства DC-SIGN и лангерина. Рецепторы семейства DC-SIGN, которые связывают декстраны, включают DC-SIGN, L-SIGN у людей, а также SIGN-R1 и -R3 у мышей [7, 8, 32, 33]. Декстраны также могут попадать внутрь клеток через механизмы неспецифического эндоцитоза жидкой фазы. При этом в ДК, в отличие от макрофагов, захваченный декстран (особенно, с низкой молекулярной массой) способен попадать в цитоплазму клеток [34]. Таблица 1 показывает на примерах механизмы клеточного захвата декстрана, связанные с определенными типами клеток и рецепторов. МР [35] и DC-SIGN [36] активируют клатрин-зависимый эндоцитоз; МР и рецепторы семейства DC-SIGN являются необходимыми и достаточными для рецептор-опосредованного поглощения декстрана незрелыми ДК, полученными из моноцитов человека (МоДК) [7, 37].

Таблица 1. Механизмы эндоцитоза декстрана в клетках разных типов

Эндоцитоз	Характеристики захвата декстрана
Клатрин-зависимый эндоцитоз, рецептор-зависимый захват	<p>1) МР-зависимый клатрин-зависимый эндоцитоз флуоресцентно меченого декстрана:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Незрелые МоДК человека, одновременно с макропиноцитозом [38] ● Незрелые МоДК человека, зависимость от экспрессии МР [39] ● Незрелые ДК селезенки и костного мозга мышей (меченый декстран с молекулярной массой 3, 70, 500 и 2000 кДа) [34] ● ЭКСП мыши [40] <p>2) Клатрин-зависимый эндоцитоз флуоресцентно меченого декстрана, зависимый от рецепторов семейства DC-SIGN (рецептор-положительные клетки = трансфектанты):</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Макрофаги селезенки мыши <i>in vivo</i>, SIGN-R1-зависимый захват [33] ● Макрофаги селезенки мыши (SIGN-R1-зависимый захват) [41] ● L-SIGN-положительные клетки яичника хомяка, линия Cho [32] <p>3) Лангерин-зависимый клатрин-зависимый эндоцитоз флуоресцентного</p>

декстрана в лангерин-положительных клетках НЕК293Т [8]

4) Никакие другие рецепторы, по имеющимся данным, не связывают декстран

Макропиноцитоз или эндоцитоз жидкой фазы	Захват флуоресцентно меченых декстранов через эндоцитоз жидкой фазы: <ul style="list-style-type: none"> ● Незрелые ДК человека, одновременно с МР-зависимым клатрин-зависимым эндоцитозом [38] ● Макрофаги костного мозга мыши [42] ● Незрелые ДК костного мозга мыши (зрелые не захватывают) [43]
Фагоцитоз	Использование термина некорректно для частиц декстрана <0.5 мкм в диаметре

Примечание: МоДК — дендритные клетки, полученные из моноцитов; МР — маннозный рецептор; ЭКСП — эндотелиальные клетки синусоидов печени

Флуоресцентно меченые декстраны стали популярны в исследованиях эндоцитоза с 1976 года, когда были разработаны первые флуоресцентно меченые декстраны (FITC-декстран) [44]. В 1978 году была опубликована классическая работа по контролю закисления лизосом с помощью FITC-декстрана [45]. В последние десятилетия меченые декстраны широко используются в качестве маркеров лизосом [46], чтобы оценить эндоцитоз жидкой фазы [47], эндоцитоз в целом [48], фагоцитоз [49, 50], макропиноцитоз [51], и макропиноцитоз совместно с МР-опосредованным захватом [38]. Кроме этого, меченые декстраны используют в качестве лиганда МР [52], в качестве лиганда SIGN-R1 [33], в качестве лиганда МР и одновременно DC-SIGN [37].

Использование декстрана в качестве маркера различных процессов эндоцитоза требует разделения понятий клатрин-зависимого эндоцитоза, эндоцитоза жидкой фазы и фагоцитоза. При клатрин-зависимом эндоцитозе декстрана захват зависит от рецепторов, включая МР, DC-SIGN, L-SIGN, SIGN-R1, SIGN-R3 и Лангерин. Клатрин-зависимый эндоцитоз характерен для частиц размером до ~200 нм [53].

Декстраны, растворенные в культуральной среде, могут быть интернализированы эндоцитозом жидкой фазы вне зависимости от взаимодействия с рецепторами. В случае эндоцитоза жидкой фазы возможные механизмы включают в себя макропиноцитоз или Cdc42-зависимый CLIC/GEEC пиноцитоз. Разные механизмы эндоцитоза могут быть активированы одновременно.

1.1.2. Декстран-связывающие рецепторы

Маннозный рецептор (MR, CD206) — рецептор к углеводам из суперсемейства лектинов С-типа [35, 54]. Он экспрессируется в клетках эндотелия печени и селезенки, в макрофагах, и в меньшей степени в ДК [13]. Главная роль MR у млекопитающих: захват гликопротеинов в печени для их последующего катоболизма [55, 56]. MR также вносит вклад в распознавание и фагоцитоз патогенных микроорганизмов и аллергенов, развитие Th2 иммунного ответа, и презентацию антигенов [16, 54]. Доказано поглощение декстрана MR-зависимым эндоцитозом (Таблица 1).

Рецептор DC-SIGN — рецептор к углеводам из суперсемейства лектинов С-типа [57]. Он экспрессируется МоДК *in vitro* и *in vivo* [58], дендритными клетками кожи, кишечника, слизистой оболочки половых органов *in vivo* [59, 60]; активированными В-клетками [61], ИЛ-4-активированными и М-CSF-активированными макрофагами, ассоциированными с опухолью макрофагами [62], альвеолярными макрофагами [12]. Этот рецептор отвечает за взаимодействия ДК с Т-клетками [63], сосудистым и лимфатическим эндотелием [64], включая эндотелий пупочной вены [65]. Кроме этого DC-SIGN связывает патогенные микроорганизмы [6] и аллергены [66], обеспечивая их поглощение и/или активацию внутриклеточных сигнальных путей.

Передача внутриклеточных сигналов с помощью DC-SIGN ограничивает Th1 ответ, активируемый через TLR и через Raf1 киназы [67]. DC-SIGN связывает молекулы поверхности возбудителей бактериальной, вирусной, грибковой природы, а также простейших и многоклеточных паразитов. Патогены, распознаваемые через DC-SIGN, включают микобактерии туберкулеза, ВИЧ-1 и многие другие. Антигенное взаимодействие с DC-SIGN сдвигает Th1/Th2 баланс в сторону Th2, вызывая хроническую инфекцию [6]. Рецептор DC-SIGN человека имеет гомолог, L-SIGN, экспрессируемый в основном в печени [68]. Существует восемь ортологов DC-SIGN мыши: SIGN-R1–SIGN-R8 [69]. Поглощение декстрана с помощью рецепторов семейства DC-SIGN: DC-SIGN, L-SIGN, SIGN-R1 и SIGN-R3 показано на уровне конкурентного ингибирования в клеточных моделях [7, 8, 32, 33], но параметры связывания декстрана с этими рецепторами не исследованы. Клетки, которые экспрессируют рецепторы семейства DC-SIGN, способны захватывать декстран (таблица 2).

Лангерин является рецептором специфичным для клеток Лангерганса кожи [70] и поглощение декстрана через Лангерин доказано [8].

Рецепторы LSECtin человека и мыши экспрессируются в основном эндотелиальными клетками синусов печени (ЭКСП) и клетками лимфатического эндотелия [71]. Клетки, экспрессирующие LSECtin захватывают декстран (таблица 2). Связывание этих рецепторов с декстраном не исследовано, но может предполагаться на основе косвенных данных [72].

Таблица 2. Захват декстрана и экспрессия рецепторов MP, DC-SIGN, мышинных гомологов DC-SIGN, лангерина и LSECtin в клетках разных типов

Орган	Экспрессия рецепторов (рецептор: тип клеток)	Захват декстрана
Печень	1) MP: клетки Купфера, ЭКСП [13] 2) L-SIGN и LSECtin: ЭКСП [68]	1) Захват декстрана показан в клетках Купфера [73] и в ЭКСП [74] 2) Захват декстрана показан в ЭКСП [74]; в ДК печени [75]
Селезенка	1) MP: макрофаги селезенки, эндотелий [13] 2) SIGN-R1: макрофаги селезенки [33] DC-SIGN: ДК селезенки [63]	1) Захват декстрана показан в фагоцитах [73] и его можно предполагать для эндотелиоцитов [76] 2) SIGN-R1-зависимый захват декстрана показан в макрофагах селезенки [33]; захват декстрана показан в фагоцитах [73] и ДК селезенки [75]
Легкие	1) MP: альвеолярные макрофаги [13] 2) DC-SIGN: альвеолярные макрофаги [12]	1, 2) Захват декстрана показан для альвеолярных макрофагов [77]
Почки	MP: макрофаги, мезангиальные клетки [13]	Захват декстрана показан для макрофагов [73] и мезангиальных клеток [78]
Сердце	MP: макрофаги [13]	Захват декстрана показан для фагоцитов [73]
Мозг	MP: клетки ретинальной микроглии [79]	Захват декстрана показан [79]
Кожа	MP: эндотелиоциты капилляров [80]	Захват декстрана показан [80]

Лимфатическая система	1) МР: эндотелий лимфатических протоков [81] 2) L-SIGN и LSECtin: эндотелий лимфатических протоков и лимфоузлов [68, 82]; LSECtin: ДК тимуса и периферической крови [68]	1) Захват декстрана (или его связывание) лимфатическим эндотелием [83-85] 2) Захват декстрана (или его связывание) лимфатическим эндотелием [83, 85]
АПК	1) МР: АПК кожи, мышц, слюнных желез, щитовидной железы, поджелудочной железы [86] 2) DC-SIGN: человеческие незрелые МоДК, ДК слизистых, незрелые ДК кожи и гланд, и зрелые ДК лимфоидной ткани [63]; предшественники плазматоидных ДК [12]	1, 2) Захват декстрана показан для человеческих незрелых МоДК и клеток лангерганса [87], плазматоидных ДК [88]

Примечание. ЭКСП — эндотелиальные клетки синусов печени, ДК — дендритные клетки, МоДК — дендритные клетки, полученные из моноцитов, АПК — антиген-представляющие клетки

1.1.3. Фармакокинетика декстрана

Судьба клинических декстранов в организме человека и млекопитающих исследована достаточно подробно. Когда клинический декстран вводится внутривенно, одна его часть поглощается клетками, другая часть выводится через почки, и еще часть удерживается в кровотоке. Соотношение этих частей зависит от молекулярной массы и вводимой дозы [23, 73, 89]. Основные органы захвата декстрана: печень, селезенка, легкие и почки. Декстран из крови может попадать в межклеточный матрикс, а затем в лимфу, после чего назад в кровоток. Гепатоциты способны транспортировать небольшие количества декстрана с желчью [73, 90-93]. По-видимому, захват декстрана гепатоцитами — неспецифический процесс, так как он не ингибируется другими полисахаридами. Связывание декстрана непаренхимными клетками печени примерно в 2,6 раза больше, чем гепатоцитами [94]. Почечная фильтрация декстрана зависит от его молекулярной массы: молекулы с массой меньше, чем ~ 50 кДа выводятся из организма быстро, в то время как более крупные остаются в крови в течение длительного времени (Рисунок 2) [91, 95]. Клетки, захватывающие декстран, могут метаболизировать его до

глюкозы крайне медленно, используя кислую и нейтральную α -глюкозидазы [3, 96-98]. Молекулы глюкозы, полученные при расщеплении декстрана, участвуют в обменных процессах и метаболизируются до углекислого газа [99, 100].

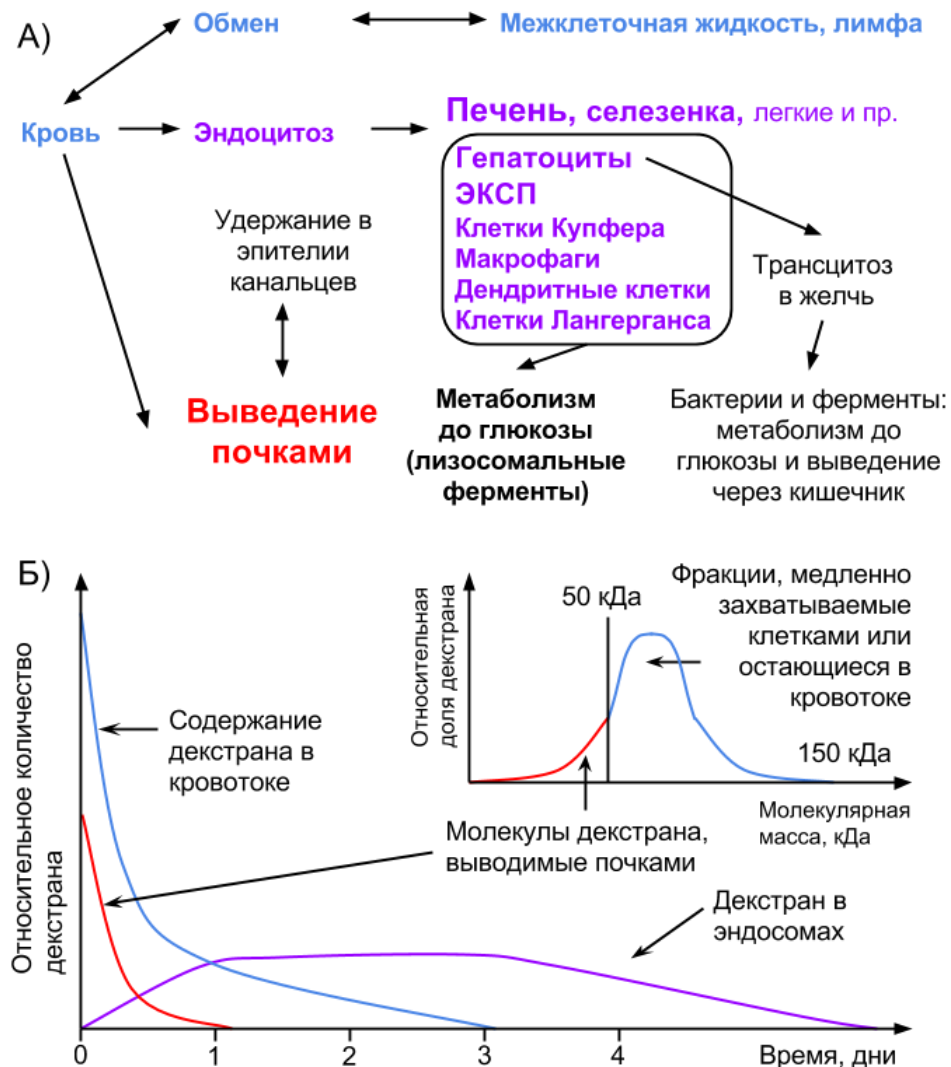


Рисунок 2. Метаболизм декстрана. А) Метаболизм в тканях. Б) Динамика выведения

Примечание. А) Декстран из кровотока попадает в межклеточную жидкость и лимфатические протоки. Основными органами захвата декстрана являются печень, селезенка и легкие. Клетки почек захватывают декстран с помощью пиноцитоза, но лишь временно его удерживают. Б) Динамика экскреции и метаболизма декстрана. После инъекции декстрана через почки быстро выводятся фракции с низкой молекулярной массой. Более тяжелые фракции циркулируют в жидкостях организма и попадают в эндосомы. Объем эндосом, куда может попасть декстран, ограничен, и часть декстрана остается в кровотоке. В эндосомах декстран метаболизируется или выводится трансцитозом. Возобновление запасов декстрана в эндосомах возможно пока его фракции присутствуют в крови

ЭКСП — эндотелиальные клетки синусов печени

1.2. Роль декстран-связывающих рецепторов при инфекциях

При широком ряде бактериальных, грибковых и вирусных инфекций заражение клеток и модуляция иммунного ответа зависят от декстран-связывающих рецепторов (таблица 3). Исследование эффектов декстрана и конъюгатов декстран-лекарство в моделях таких инфекций представляет большой интерес.

Таблица 3. Декстран-связывающие рецепторы обеспечивают вход патогенов в клетки, а запускаемые через эти рецепторы сигнальные пути модулируют иммунный ответ клеток

Рецептор	Патогены	Роль рецептора в инфекции
Маннозный рецептор	1. <i>M. tuberculosis</i> ; <i>M. kansasii</i> , <i>M. phlei</i> , and <i>M. smegmatis</i>	1. Захват бактерии в клетки [101, 102], ингибирование фагосомально-лизосомального слияния [103] и ограничение Th1 ответа [16]
	2. <i>Retroviridae</i> (ВИЧ-1; вирус Висна/Мэди; лентивирусы мелких жвачных)	2. Захват вируса [104], индукция ИФН- γ [105], повышение эффективности передачи половым путем [106], транс-инфекция [104]; захват вируса (овца) [107]; усиленное повреждение органов [108]
	3. <i>Candida albicans</i>	3. Захват клеток гриба [109], нарушение внутриклеточного переваривания [110]
	4. <i>Orthomyxoviridae</i> (вирусы гриппа)	4. Захват вируса [111]
	5. <i>Flaviviridae</i> (вирус денге)	5. Захват вируса [112]
	6. <i>Rhabdoviridae</i> (вирус везикулярного стоматита)	6. Индукция ИФН- γ [105]
	7. <i>Herpetoviridae</i> (вирус простого герпеса)	7. Индукция ИФН- γ [105]
	8. <i>Hepadnaviridae</i> (вирус гепатита В)	8. Захват вируса [113]
	9. <i>Schistosoma mansoni</i>	9. Индукция Th2 фенотипа [114]
	10. <i>Bunyaviridae</i> (вирус лихорадки долины Рифт, вирус Тоскана, вирус Укуниеми)	10. Захват вируса [115]
	11. <i>Paramyxoviridae</i> (вирус кори)	11. Захват вируса, инфекция ДК и Т клеток

		[116]
	12. <i>Francisella tularensis</i>	12. Захват бактерии [117]
	13. <i>Yersinia pestis</i>	13. Захват бактерии [118]
	14. <i>Leishmania</i> spp.	14. Захват простейшего, модуляция иммунного ответа [119, 120]
DC-SIGN	1. <i>M. tuberculosis</i>	1. Захват бактерии в ДК [121], ограничение Th1 ответа [6]
	2. <i>Retroviridae</i> (ВИЧ-1; человеческий Т-лимфотропный вирус 1)	2. Захват вируса и транс-инфекция Т лимфоцитов [122]; взаимодействие с сигнальными путями Nef-1 и снижение продукции ИЛ-6 [123]; связывание [124], захват вируса, инфекция и транс-инфекция [125]
	3. <i>Candida albicans</i>	3. Захват клеток гриба [126]
	4. <i>Orthomyxoviridae</i> (вирусы гриппа)	4. Захват вируса и транс-инфекция [127]; усиленная репликация вируса [128]
	5. <i>Coronaviridae</i> (ТОРС; вирус инфекционного бронхита)	5. Захват вируса [129]; захват вируса [130]
	6. <i>Arenaviridae</i> (вирус Ласса, вирус Хунин)	6. Захват вируса [131]; захват вируса [132]
	7. <i>Flaviviridae</i> (вирус гепатита С; вирус денге; вирус лихорадки Западного Нила, вирус клещевого энцефалита)	7. Захват вируса [133]; захват вируса [134], активация тромбоцитов [135]; захват вируса [136]; предрасположенность к тяжелым формам энцефалита [137]
	8. <i>Paramyxoviridae</i> (респираторно-синцитиальный вирус человека)	8. Модуляция иммунного ответа [138]
	9. <i>Herpesviridae</i> (цитомегаловирус, вирус герпеса 8)	9. Захват вируса и транс-инфекция [139], захват вируса [140, 141]
	10. <i>Filoviridae</i> (вирус эбола; вирус марбург)	10. Захват вируса, транс-инфекция [129, 142]
	11. <i>Helicobacter pylori</i>	11. Захват бактерии, модуляция иммунного ответа [143]

	12. <i>Leishmania sp.</i>	12. Захват простейшего, модуляция иммунного ответа [120, 143-145]
	13. <i>S. mansoni</i>	13. Распознавание антигенов паразита, модуляция иммунного ответа [143]
	14. <i>Togaviridae</i> (вирус синдбис)	14. Захват вируса [146]
	15. <i>Escherichia coli</i>	15. Захват бактерии [147]
	16. <i>Klebsiella pneumoniae lipopolysaccharide serotype O3</i>	16. Связывание бактерии [143]
	17. <i>Bacteroides fragilis</i>	17. Захват и представление Т клеткам [148]
SIGN-R1	1. <i>M. tuberculosis</i>	1. Захват бактерии, модуляция иммунного ответа [149]
	2. <i>Candida albicans</i>	2. Захват клеток гриба [150]
	3. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3. Защитная роль рецептора [151], важен в формировании IgM ответа [152]
SIGN-R3	1. <i>M. tuberculosis</i>	1. Захват бактерии, модуляция иммунного ответа [153]
	2. <i>Leishmania spp.</i>	2. Захват простейшего, модуляция иммунного ответа [145]
L-SIGN	1. <i>M. tuberculosis</i>	1. Захват бактерии, модуляция иммунного ответа [149]
	2. <i>Retroviridae</i> (ВИЧ-1, ВИЧ-2; вирус иммунодефицита обезьян)	2. Захват вируса и транс-инфекция [82, 154]
	3. <i>Coronaviridae</i> (вирус инфекционного бронхита)	3. Захват вируса [130]
	4. <i>Arenaviridae</i> (вирус Ласса, вирус Хунин)	4. Захват вируса [132]
	5. <i>Flaviviridae</i> (вирус гепатита С; вирус лихорадки западного нила)	5. Захват вируса [133, 155]; захват вируса [136]
	6. <i>S. mansoni</i>	6. Связывание с патогеном [156]
	7. <i>Filoviridae</i> (вирус эбола; вирус марбург)	7. Захват вируса и транс-инфекция [142, 157]; захват вируса [129]
	8. <i>Coronaviridae</i> (ТОРС коронавирус)	8. Захват вируса [129]

	9. <i>Togaviridae</i> (вирус синдбис)	9. Захват вируса [146]
	10. <i>Leishmania infantum</i>	10. Захват простейшего [144]
Лангерин	1. <i>Mycobacterium leprae</i>	1. Захват бактерии, представление антигенов [158]
	2. <i>Retroviridae</i> (ВИЧ-1)	2. Захват вируса [159]
	3. <i>Candida</i> spp. (включая <i>C. albicans</i>), <i>Saccharomyces</i> sp., и <i>Malassezia furfur</i>	3. Захват клеток гриба [160]
	4. <i>Paramyxoviridae</i> (вирус кори)	4. Захват вируса [161]
LSEctin (вероятный декстран- связывающий рецептор)	1. <i>Hepadnaviridae</i> (вирус гепатита В)	1. Снижение воспаления, но увеличенное время освобождения печени от вируса [162]
	2. <i>Filoviridae</i> (вирус эбола)	2. Захват вируса, усиление инфекции [163, 164]
	3. <i>Coronaviridae</i> (ТОРС коронавирус, ТОРС)	3. Захват вируса, усиление инфекции [163]
	4. <i>Flaviviridae</i> (вирус гепатита С)	4. Захват вируса [165]
	5. <i>Arenaviridae</i> (вирус Ласса)	5. Захват вируса [166]

1.2.1. Роль DC-SIGN и MR в патогенезе ВИЧ инфекции

Рецептор DC-SIGN. При ВИЧ-инфекции связывание DC-SIGN с гликопротеином ВИЧ gp120 считается важным этапом заражения клеток. В качестве ингибиторов связывания DC-SIGN с оболочкой ВИЧ-1 были исследованы: антитела к DC-SIGN [122], короткие шпилечные РНК, подавляющие экспрессию гена *DC-SIGN* [167] и агенты, связывающиеся с углеводами [168]. Разработан высокопроизводительный метод скрининга ингибиторов взаимодействия DC-SIGN и gp120 [169]. Блокирование DC-SIGN позволяет предотвратить связывание и передачу человеческих ретровирусов, что указывает на пригодность DC-SIGN в качестве мишени для разработки лекарственных препаратов [170, 171].

Половой путь передачи ВИЧ-инфекции является наиболее распространенным [172, 173]. ДК слизистой оболочки кишечника и половых органов экспрессируют DC-SIGN [59], эти клетки могут быть инфицированы и могут с высокой эффективностью транс-инфицировать Т-клетки, основные мишени ВИЧ. DC-SIGN важен для формирования инфекционных синапсов, передающих ВИЧ от ДК к Т-клеткам [174, 175]; активация сигнальных путей с помощью DC-SIGN активирует захват вируса [176] и продуктивную инфекцию [177], модулирует регуляторные функции ДК [67]. Ряд антиретровирусных препаратов по принципу действия

являются ингибиторами входа (слияния) ВИЧ [178], но до сих пор нет ингибиторов взаимодействия ВИЧ-DC-SIGN, которые бы проходили клинические испытания, несмотря на известную важность данного рецептора в инфекции ДК и транс-инфекции Т-клеток, и обилие экспериментальных работ в этой области [122, 167, 168].

Маннозный рецептор. Ингибирование маннозного рецептора макрофагов человека приводит к снижению связывания макрофагов с ВИЧ на 60% [104]. Данный рецептор отвечает за индукцию ИФН- γ в ответ на заражение [105], но одновременно повышает эффективность передачи ВИЧ половым путем [106]. Известно, что через МР может происходить транс-инфекция Т лимфоцитов от ВИЧ-инфицированных макрофагов [104].

1.2.2. Роль DC-SIGN и МР при туберкулезе

Рецептор DC-SIGN. При захвате микобактерий дендритными клетками и макрофагами посредством DC-SIGN происходит изменение профиля экспрессии цитокинов, регулирующих иммунный ответ [179]. После этого не происходит ни деградации микобактерий в фагосомах, ни презентации их антигенов [180]. При захвате микобактерий в фагосомы происходит секреция дендритными клетками компонента микобактерий маннозилированного липоарабиноманнана (ManLAM). Эта молекула связывает DC-SIGN других дендритных клеток, а также модулирует их ответ на микобактерии. Дендритные клетки способны связывать микобактерии посредством рецепторов TLR, что активирует NF- κ B-зависимый сигнальный путь, и приводит к созреванию и активации дендритных клеток (повышается экспрессия костимулирующих молекул CD80, CD83 и CD86). Созревание дендритных клеток ведет к продукции воспалительных цитокинов и выходу на поверхность клеток комплексов антигенов с молекулами МНС второго класса, что приводит к развитию специфического Т-клеточного иммунитета [181], необходимого для эффективной борьбы с микобактериями.

Микобактерии индуцируют повышение экспрессии DC-SIGN на поверхности альвеолярных макрофагов [182]. У здоровых людей CD11b⁺ макрофаги легких, экспрессирующие DC-SIGN, составляют около 3% от всей популяции; у зараженных микобактерией – порядка 70%. Предполагают, что повышение экспрессии этого рецептора не связано с действием цитокинов ИЛ-4 или ИЛ-13, которые способны вызывать такую реакцию *in vitro* [183]. Более вероятно действие белковых или липидных факторов, секретируемых микобактериями, кроме этого возможно участие ИЛ-15 [182]. Показано отсутствие роли ИЛ-10 в возможной иммуносупрессии, вызванной связыванием между DC-SIGN и его лигандами у легочных макрофагов. С другой стороны, ИЛ-10 может все же повышать экспрессию DC-SIGN в лимфатических узлах за счет рецепторов дендритных клеток, что показано ранее [14].

Альвеолярные макрофаги, экспрессирующие DC-SIGN, являются преимущественной мишенью для микобактерий, по сравнению с клетками, не экспрессирующими DC-SIGN [182].

Показано, что DC-SIGN в дендритных клетках человека является основным рецептором к микобактериям туберкулеза, и что связывание с бактериями происходит, по меньшей мере частично, через компонент стенки микобактерий маннозилированный липоарабиноманнан [14]. Антитела к DC-SIGN ингибируют связывание бактерий с дендритными клетками на 80% [184]. Предполагают, что после связывания DC-SIGN-ManLAM, сигнал от рецептора DC-SIGN ингибирует сигнал от рецептора TLR4, также связывающего микобактерии. Это приводит к экспрессии ИЛ-10, что нарушает способность дендритных клеток генерировать Th1 ответ: блокируется продукция ИЛ-12 и экспрессия молекул костимуляции [180, 184].

Микобактерии синтезируют избыток ManLAM, который попадает в межклеточную среду. Анализ антител у больных туберкулезом показал, что одной из главных фракций являются антитела к ManLAM [185]. Липоарабиноманнан больных туберкулезом попадает в кровь и выводится с мочой. Ранее были разработаны тесты для иммуноферментного определения этого липида в качестве маркера заболевания [186].

Маннозилированный липоарабиноманнан — не единственный лиганд, ответственный за связывание между микобактериями и DC-SIGN; известны не все поверхностные молекулы микобактерий, связывающиеся с DC-SIGN [187, 188]. Полагают, что важнейшей ролью DC-SIGN в иммунном ответе на микобактерии может являться иммуномодуляция через этот рецептор [189]. Влияние DC-SIGN на течение туберкулеза подтверждается тем, что полиморфизм по гену *DC-SIGN* у человека влияет на заболеваемость туберкулезом — носители ряда аллелей болеют с меньшей вероятностью [190-193].

Альтернативная активация макрофагов не способствует борьбе макрофагов с микобактериями [194]. Моноциты при стимуляции ИЛ-4 способны также экспрессировать DC-SIGN [195]. А ИЛ-4 - естественный регулятор повышения экспрессии данного рецептора при микобактериальной инфекции [196]. В то же время ИЛ-4 и ИФН- γ — находятся в отношениях реципрокной регуляции, что хорошо согласуется с положением о том, что альтернативная и классическая активация иммунитета — конкурентные реакции, определяющие соотношение между Th1 и Th2 пулами Т-лимфоцитов [197]. При развитии туберкулеза, как утверждают некоторые авторы, проблема в индуцированной ИЛ-4 и ИЛ-4 δ 2 Th2 реакции, ведущей к нарушению бактерицидной функции клеток и в итоге к фиброзу [198].

Отдельный интерес представляют сигнальные внутриклеточные пути, определяющие реакцию на взаимодействие DC-SIGN с его лигандами. Реакция на связывание патогенов с DC-SIGN модулирует эффекты от взаимодействия с другими рецепторами — TLR2, TLR3, TLR4, TLR7/8 [199]. Существуют белки, всегда активирующиеся при связывании DC-SIGN с

лигандами. Например, активируется серин/треониновая киназа Raf-1, активация которой в случае связывания многих патогенов приводит к ацетилированию субъединицы NF- κ B p65, которая пролонгирует и усиливает продукцию противовоспалительного ИЛ-10 [67]. Запускаются и другие сигнальные пути, продолжающие активацию Raf-1; они зависят от конкретного патогена [199]. В случае с ManLAM сигналы от DC-SIGN может модулировать TLR2 за счет образования комплекса DC-SIGN-TLR2 на мембране [200].

Маннозный рецептор. Моноциты, выделенные из крови, не экспрессируют МР, однако ГМ-КСФ и ИЛ-4, с помощью которых индуцируется дифференцировка из них незрелых дендритных клеток, индуцируют экспрессию этих рецепторов [39]. Незрелые дендритные клетки, полученные из моноцитов (МоДК), имеют высокий уровень экспрессии МР. В случае добавления к культуре МоДК ManLAM повышается продукция ИЛ-10, антагониста ИЛ-1R и несигнального ИЛ-1R второго типа, ингибируется продукция ИЛ-12. Такие дендритные клетки не стимулируют Th1 ответ, не выделяют хемокины CXCL10 и CCL19. Наоборот, в них усилена продукция CCL22 и CCL17, способствующих пролиферации пула Th2 клеток. Не способны к активации такого типа (как ManLAM) другие лиганды МР: маннан, и что важно отметить — декстран [16].

Микобактерии, как и ManLAM, индуцируют в макрофагах человека экспрессию PPAR γ через взаимодействие с маннозным рецептором, что приводит к повышению экспрессии ИЛ-8 и COX-2 [201]. Помимо этого ManLAM индуцирует в макрофагах секрецию TNF- α , ИЛ-1 и ИЛ-6 и ингибирует T-клеточный пролиферативный ответ. Полагают, что ManLAM может не только связываться с рецепторами на поверхности клеток, но и включаться в состав их мембран [202]. В ответ на добавление ManLAM в макрофагах человека растет уровень внутриклеточного Ca²⁺, что может блокироваться добавлением антител к МР или CD14. Это может свидетельствовать о взаимодействии между МР и CD14 при захвате липоарабиноманнана [203]. В связи с этим стоит отметить, что повышение уровня внутриклеточного Ca²⁺ может препятствовать фагосомально-лизосомальному слиянию, и способствовать внутриклеточной персистенции микобактерий туберкулеза [204]. Полагают, что именно маннозный рецептор отвечает за ManLAM-опосредованный процесс созревания фагосом; отсутствие рецептора приводит к слиянию фагосом, содержащих микобактерии, с лизосомами [103]. С другой стороны, блокада МР антителами или его лигандами приводит к тому, что фагоцитоз вирулентных микобактерий макрофагами снижается на 40-60% [102]. В культивируемых моноцитах микобактерии туберкулеза и ManLAM через маннозный рецептор активируют продукцию металлопротеиназы-9, это доказано при помощи антител-ингибиторов рецептора [205].

Лиганды маннозного рецептора маннан и конъюгат манноза-БСА снижают степень захвата вирулентных микобактерий Erdman и H37Rv в среднем на ~60%, N-ацетил-глюкозамин-

БСА на ~40%; как минимум на 40% снижается захват бактерий при добавлении антител к МР. Захват микобактерий ингибирует отрицательная регуляция экспрессии МР — примерно на 50% [102]. Подобная картина наблюдается, когда вместо соответствующих бактерий используются микросферы, конъюгированные с липоарабиноманнаном. Добавление конъюгата манноза-БСА в некоторых случаях приводит к >60% ингибированию захвата таких микросфер [206].

Влияние лигандов маннозного рецептора на Th1 ответ и его ответственность за фагоцитоз патогенов макрофагами известны давно [16], однако сигнальные пути, активируемые через МР, были изучены недавно [207, 208]. Взаимодействие некоторых лигандов с МР активирует через белок Grb2 сигнальный каскад Rac/Pak/Cdc-42, необходимый для фагоцитоза, а также активирует MAP киназы и сигнальный путь PI3k/Akt. Это приводит к активации экспрессии PPAR γ и негативной регуляции транскрипционного фактора NF- κ B. Также через белок SHP-1 опосредуется снижение уровня фагосомально-лизосомального слияния и ингибирование экспрессии провоспалительных цитокинов [207, 208].

1.2.3. Эффекты декстрана и его производных в инфекционных моделях

В ранних исследованиях, посвященных влиянию декстрана на патогенез туберкулеза, было показано, что декстран ускоряет размножение микобактерий туберкулеза в макрофагах [209], а введение микобактерий в смеси с декстраном приводит к развитию более тяжелого поражения легких в моделях *in vivo* [210, 211]. Вместе с тем, позднее было показано, что декстран способствует гибели микобактерий БЦЖ внутри перитонеальных макрофагов мыши: уровень гибели микобактерий внутри макрофагов в контроле составил 33%, а с добавлением декстрана (22 мкг/мл) — 39% [212]. Работы с производными декстрана продемонстрировали возможные положительные эффекты декстрана при микобактериальной инфекции. Конъюгат декстран-изониазид был исследован в модели туберкулезного гранулематоза, вызванного БЦЖ. Фиброз тканей в этой модели был значительно снижен при регулярном введении декстран-изониазида по сравнению со свободным изониазидом. Фиброз легких снизился на 30%, селезенки в 3,5 раза, а печени более чем в четыре раза. Гепатотоксичность снизилась в 2,2 раза, а развитие некроза в гранулемах уменьшилось в 10 раз [213]. Уменьшение структурных перестроек в легких может быть полезно при туберкулезе для снижения вероятности образования очагов некроза в гранулемах и последующей передачи заболевания [214], а также может способствовать доставке лекарств к микобактериям внутри гранулемы, что является важной проблемой [215].

В модели системного заражения мышей кандидозом, конъюгат декстран-амфотерицин В, вводимый через 10 дней после заражения, сократил количество гранул в печени в четыре раза [216]. В моделях вирусных инфекций, вызванных вирусами гриппа А и В (куриные

эмбрионы, мыши) и модели клещевого энцефалита (мыши) конъюгат декстран-ремантадин показал значительно лучший защитный эффект, чем свободный ремантадин [217]. В результате этих экспериментов остается неясно, способен ли свободный декстран или декстран в смеси с лекарствами вызвать подобные эффекты при лечении инфекций.

В модели БЦЖ-индуцированного гранулематоза мышам регулярно вводили окисленный декстран (ОД, декстран, содержащий менее 3% остатков глюкозы, окисленных с образованием альдегидных групп). Введение ОД снизило число и размеры гранул в органах; увеличилось число фибробластов в гранулемах (параллельно снизилась их активность); уменьшились некротические изменения в печени; уменьшились фиброзные изменения в печени и легких [218]. В модели гриппа мышей ОД снизил уровень гибели животных в 3,3 раза и значительно снизил фиброз в легких [219]. В модели системного кандидоза количество гранул в головном мозге уменьшилось в восемь раз при лечении ОД сравнению с противогрибковым средством амфотерицин В. В то время как в контрольной группе мыши погибли, 60% мышей леченых ОД выжили [213]. Декстран *per se* в качестве контроля в данных опытах не исследовали.

Таким образом, данные, полученные относительно эффектов декстрана в инфекционных моделях, противоречивы.

1.2.4. Влияние декстранов на эндоцитоз и цитокиновый ответ иммунных клеток

Профиль связывания с рецепторами у декстрана сходен с сахарами маннозой, фукозой и полисахаридом маннаном [87]. Известно, что данные лиганды DC-SIGN способны ингибировать этот рецептор, препятствуя его связыванию с маннозилированными биомолекулами поверхности патогенов. Это приводит к снижению уровня внутриклеточного захвата патогенов [121] и к изменению активации сигнальных путей [6]. Таким образом, ингибирование DC-SIGN актуально для разработки новых лекарств и вакцин. Неизвестно, ингибирует ли декстран взаимодействие патогенов с DC-SIGN (и если да, то в какой степени?), однако логично предполагать, что он обладает такой активностью.

Рецептор DC-SIGN участвует в заражении ВИЧ макрофагов и дендритных клеток, а также в DC-SIGN-опосредованном транс-инфицировании ВИЧ CD4⁺ Т лимфоцитов. В качестве ингибиторов DC-SIGN при ВИЧ инфекции исследуют различные новые соединения [8, 9]. При этом возможное влияние уже применяемых в медицине декстранов на DC-SIGN-опосредованное ВИЧ-инфицирование клеток практически не изучено.

Механизмы влияния декстрана на течение микобактериальной инфекции не изучены. В частности не известно, способен ли декстран влиять на воспалительный/цитокиновый ответ иммунных клеток при заражении микобактериями. По разным данным декстран может оказывать разностороннее влияние на инфицированные клетки и животных. Декстран

способствует гибели микобактерий БЦЖ внутри перитонеальных макрофагов мыши [212]. Рост популяции микобактерий туберкулеза в зараженной культуре перитонеальных макрофагов мыши, наоборот, стимулируется декстраном [209]. Метаболически активные микобактерии туберкулеза, в отличие от неактивных, не попадают в тот же клеточный компартмент макрофагов человека, куда захватывается декстран [220], и наоборот, в культуре человеческих макрофагов декстран не локализуется в компартментах, куда захвачены микобактерии [77]. Предварительная инкубация ДК человека с декстраном не влияет на связывание микобактерий туберкулеза с этими клетками [121]. При этом после поглощения ДК декстрана усилена активность NADPH оксидазы 2, ответственной за антимикробную активность [221].

Химические различия между декстраном и ОД, который значительно снижает уровень фиброза в модели БЦЖ-индуцированного гранулематоза, ограничиваются окислением порядка 3% остатков глюкозы, а значит основная часть структуры ОД — это неизмененный декстран. Не проверено, играет ли окисление декстрана существенную роль в антифибротических эффектах, показанных для ОД *in vivo*. Возможно, именно специфичное связывание декстрана с MR и рецепторами семейства DC-SIGN модулирует патоген-индуцированный Т-хелперный ответ на микобактерии [222, 223]. Тогда антифибротическое действие декстрана в модели БЦЖ [213, 218] может быть связано с ограничением реакции Th2, способствующей ремоделированию тканей. Таким образом, логично предполагать, что будучи лигандом рецепторов MR и DC-SIGN, декстран способен модулировать иммунный ответ на микобактерии (Рисунок 3), однако данное предположение до сих пор не проверялось.

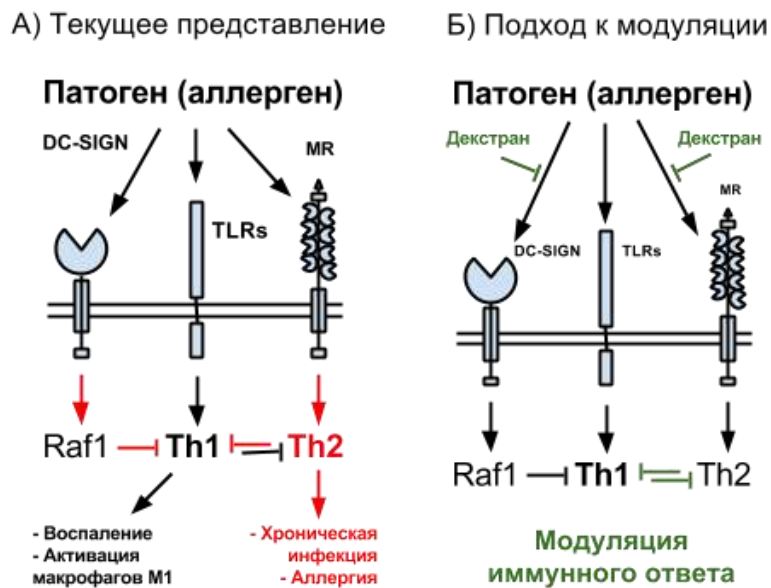


Рисунок 3. Влияние декстрана на врожденный иммунный ответ — модель

Примечание. Известно, что лиганды DC-SIGN способны предотвратить связывание и внутриклеточный захват патогенов, влияют на процесс транс-инфекции Т-клеток дендритными клетками, меняют статус активации макрофагов и дендритных клеток, и влияют на функции Т-хелперов (Th1 и Th2 фенотипы приведены в качестве примера). Декстран, вероятно, способен сместить баланс в данной системе.

Несмотря на широкое использование декстрана в разных областях медицины, фармацевтической и пищевой промышленности, систематических исследований его взаимодействия с клеточными рецепторами и влияния на инфекции ранее не проводилось. В связи с этим, **логично предполагать возможное ингибирующее действие декстрана в отношении связывающих его рецепторов, и, как следствие, его возможное влияние на патоген-индуцированный воспалительный/иммунный ответ.**

Проведение исследований в отношении модельных патогенов ВИЧ и микобактерии туберкулеза связано с чрезвычайной важностью данных инфекций. При этих инфекциях значимы предполагаемые в работе эффекты декстрана: ингибирование входа патогена и модуляция иммунного ответа на патоген. Так, разработка ингибиторов взаимодействия патогенов с рецепторами — самостоятельное направление исследований в области борьбы с ВИЧ [178], а модуляция ответа клеток хозяина при инфекциях считается перспективным направлением в лечении как ВИЧ инфекции [224], так и туберкулеза [186, 225].

Декстран-связывающие рецепторы MP, DC-SIGN/SIGN-R1/SIGN-R3, L-SIGN, и лангерин важны в патогенезе инфекционных заболеваний (Таблица 3). Молекулы, взаимодействующие с представленным рядом рецепторов, вероятно, могут быть использованы для их блокады, полезны при разработке новых способов вакцинации, иммуномодуляции и методов адресной доставки. Например, направленная доставка через MP предлагается для разработки вакцин [226], для доставки соединений в макрофаги [227] или клетки печени [228], но при этом полной ясности о собственном влиянии декстрана на данные клетки нет. В последние годы исследования, посвященные разработке терапевтических лигандов DC-SIGN, позволили лучше понять работу этого рецептора на уровне клеточной биологии [229], иммунологии [230] и биохимии [170, 171], но этих данных недостаточно для целенаправленной регуляции его работы. Можно заключить, что предложенная ранее отдельными авторами концепция терапевтических агонистов и антагонистов/ингибиторов DC-SIGN пока слабо разработана, но видится перспективной и нуждается в дальнейшем развитии [169, 231].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследований

Общий план исследований

Методология работы основана на поэтапном исследовании эффектов декстранов *in vitro* в бесклеточных системах, далее — в системах с культурами клеток и затем — на экспериментальных животных. Сначала изучали взаимодействие декстранов с рецептором DC-SIGN в бесклеточной системе и подтвердили лиганд-рецепторные отношения между ними. Далее исследовали влияние декстранов на DC-SIGN-опосредованный эндоцитоз ВИЧ, и на *M. tuberculosis*-индуцированную продукцию цитокинов в культуре клеток. Затем оценивали влияние декстранов на *M. tuberculosis*-индуцированный иммунный ответ в модели *in vivo*.

План исследований *in vivo* был одобрен Комиссией по биоэтике ЦКП «SPF-виварий» Института Цитологии и Генетики СО РАН №17 от 17.06.2013. Работа была одобрена Этическим комитетом ФГБУ ННИИТ Минздрава России, протокол №26 от 22.06.2016. Краткое описание этапов исследования в соответствии с поставленными в задачами:

1. Исследовать воздействие декстранов на связывание DC-SIGN с маннозилированным белком в бесклеточной системе

Рабочие поверхности проточных ячеек прибора связывали с разным количеством маннозилированного сывороточного бычьего альбумина (БСА-Man). В проточной жидкости были растворены внеклеточный домен DC-SIGN (с активным центром связывания) и в разной концентрации ингибиторы — декстран и олигодекстран. Измеряли связывание DC-SIGN с поверхностью методом плазмонного резонанса. Количество независимых повторов N=3.

2. Оценить влияние декстранов на DC-SIGN-зависимый эндоцитоз ВИЧ

Линию В клеток человека с экспрессией DC-SIGN заражали псевдовиром ВИЧ, до или после заражения вводили ингибиторы — декстран и олигодекстран (в разной концентрации). Измеряли количество вирусной РНК внутри и на поверхности клеток через сутки методом количественной ПЦР в реальном времени. Количество независимых повторов в опытах N≥2.

3. Определить воздействие декстранов на экспрессию, продукцию и соотношение ИФН-γ и ИЛ-10 при заражении культуры макрофагов микобактериями туберкулеза

Первичную культуру макрофагов человека заражали микобактериями H37Rv, до заражения вводили декстран и олигодекстран. Измеряли концентрации цитокинов ИФН-γ и ИЛ-10 в клеточной среде через 1 и 7 суток методом иммуноферментного анализа и содержание

мРНК ИФН- γ , ИЛ-10 и ТФР- β 1 методом количественной ПЦР в реальном времени. Количество независимых повторов в опытах $N \geq 2$.

4. В модели микобактериальной инфекции *in vivo* оценить влияние декстрана на продукцию ИФН- γ и ИЛ-10 в легких у мышей

Интраназально мышам линии BALB/c вводили убитые теплом микобактерии H37Rv в растворе декстрана или в физрастворе. Через 2 суток забирали легкие и в гомогенатах анализировали ИФН- γ и ИЛ-10 методом иммуноферментного анализа. Количество экспериментальных животных в группах сравнения $N \geq 8$.

Более подробное описание этапов исследования изложено ниже по задачам:

Влияние декстранов на связывание DC-SIGN с маннозилированным белком

(Здесь и далее в заголовках "декстраны" = декстран и олигодекстран.)

Анализ методом конкурентного поверхностного плазмонного резонанса проводили на приборе Biacore 3000, используя чип (проточные ячейки) CM4 при скорости потока 5 мкл/мин [238]. Общая схема анализа включала иммобилизацию маннозилированного и не маннозилированного (референсная поверхность) БСА на чипе, калибровка сигнала с использованием разведений внеклеточного домена DC-SIGN, измерение сигнала при использовании заданной концентрации DC-SIGN в присутствии разведений ингибиторов и определение IC_{50} (Рисунок 4).

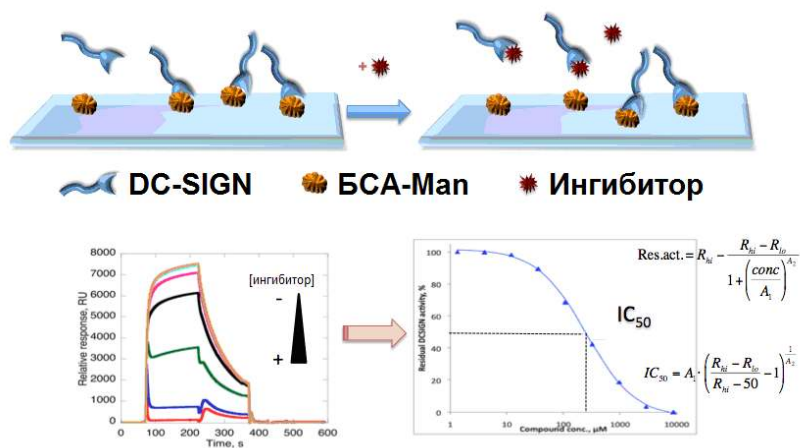
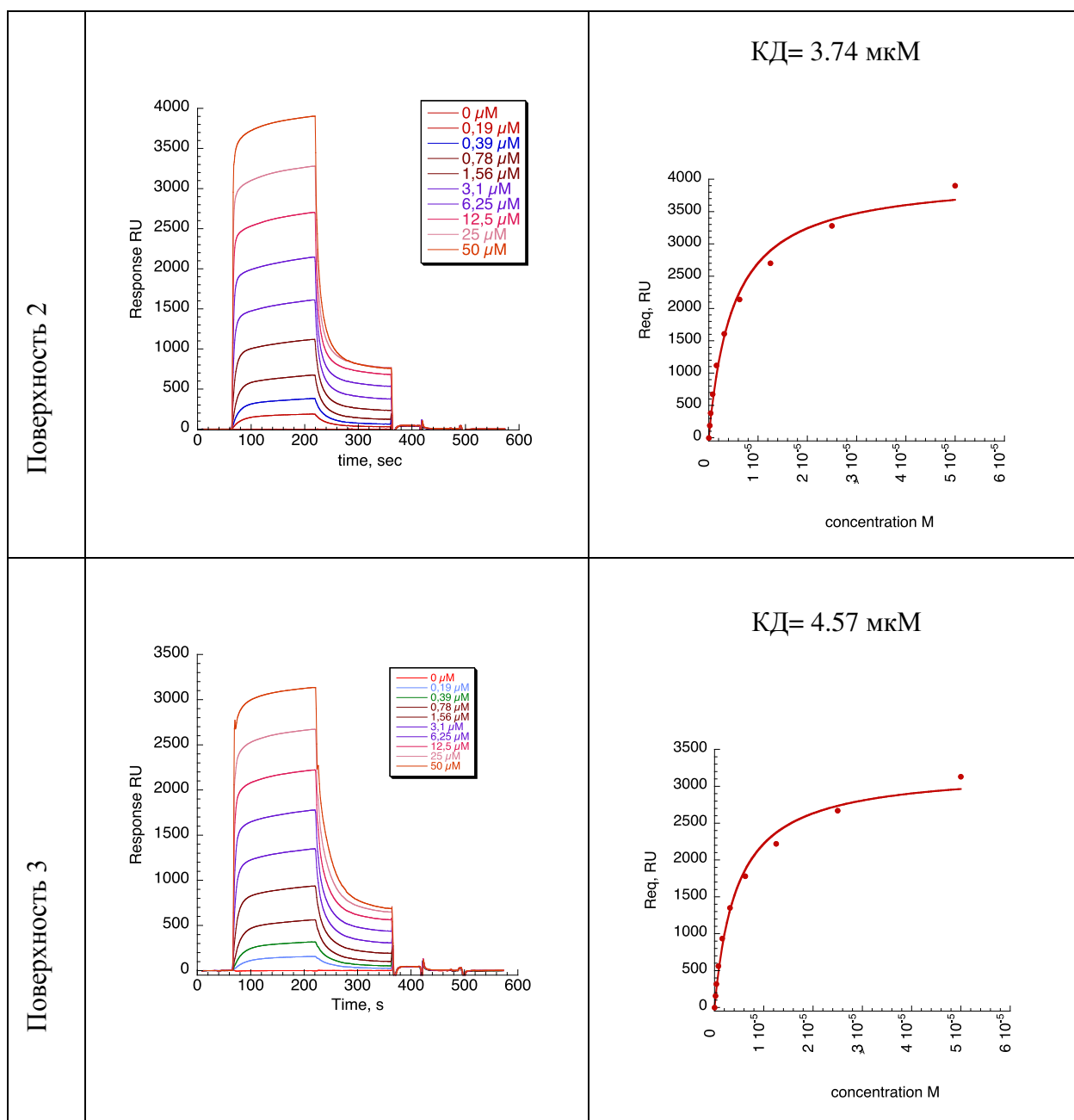


Рисунок 4. Схема исследования связывания декстрана и олигодекстрана с DC-SIGN

Примечание. Внеклеточный домен DC-SIGN связывался с маннозилированным БСА подложки; добавление ингибитора приводило к тому, что внеклеточный домен DC-SIGN связывался с ингибитором. Прикрепление DC-SIGN к подложке фиксировал прибор, результаты отражены на сенсограмме. Данные сенсограмм представляли в виде кривой ингибирования, по которой рассчитывали IC_{50} . (Изображение схемы исследований авторства коллег Франка Фиесчи и Ванессы Порколаб. Разрешение на включение изображения в работу получено).

Бычий сывороточный альбумин (БСА) или бычий сывороточный альбумин, связанный с маннозой (БСА-Man) иммобилизовали на подложке проточных ячеек методом аминосвязывания с использованием реагентов EDC и NHS. Коммерчески доступный БСА-Man, использованный в исследованиях, содержал в среднем 12 сайтов гликозилирования, представляющих разветвленный трисахарид $\text{Man}(\alpha 1,3)\text{Man}(\alpha 1,6)\text{Man}$.

Для анализа каждого вещества использовали 4 поверхности, поверхность 1 референсная покрытая БСА и три (2-4) покрытые разным количеством БСА-Man. Сначала проводили эксперимент по связыванию DC-SIGN в восьми двухкратных разведениях относительно каждой из поверхностей (Рисунок 5). Для каждой поверхности получали калибровочный график (откорректированный по референсной поверхности, покрытой БСА) для количественного определения рецептора, связанного с поверхностью ячеек.



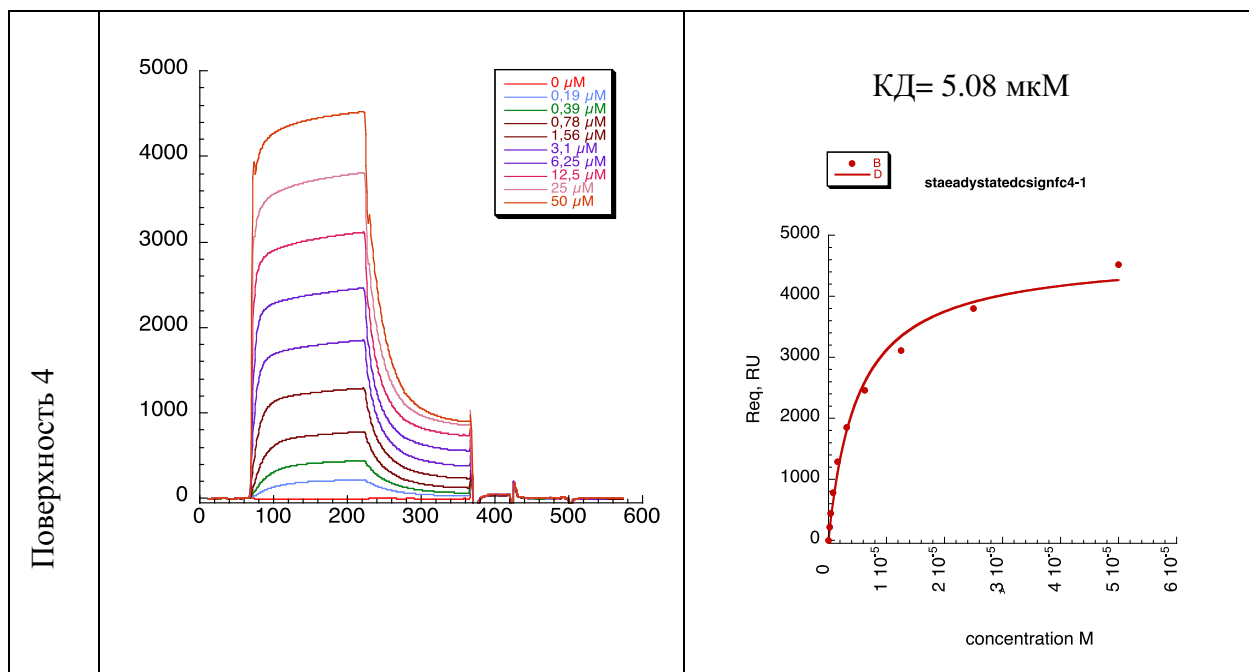


Рисунок 5. Титрование внеклеточного домена DC-SIGN: анализ связывания с поверхностями, покрытыми разным количеством БСА-Man, и расчет констант диссоциации

Исследования выполняли, используя 20 мкМ раствор внеклеточного домена DC-SIGN, содержащий повышающиеся концентрации декстрана (D66) и олигодекстрана (D06). Стабильность поверхности проточных ячеек контролировали, вводя раствор 20 мкМ внеклеточного домена DC-SIGN между циклами введения раствора с ингибиторами — снижение сигнала от поверхности было незначительным. На основании сенсограмм в опыте по ингибированию рассчитывали значения IC_{50} . Эти значения, полученные для каждой из трех поверхностей, усредняли.

Влияние декстранов на DC-SIGN-зависимый эндоцитоз ВИЧ

Работу с псевдовиром ВИЧ вели в лаборатории биологической безопасности уровня 3 (лаборатория Пуджи Джейн, Дрексельский университет). Клетки В-ТНР-1 и В-ТНР-1/DC-SIGN высевали в лунки 12-луночного планшета в количестве 1 млн клеток в 1 мл среды на лунку. Для анализа эффекта добавления веществ до инфицирования в часть лунок добавляли исследуемые вещества (декстран, олигодекстран) в дозе 0,5% (76 мкМ и 9 мМ соответственно), и через 30 минут проводили заражение клеток введением суспензии вируса в дозе 3 нг р24 (декстраны не удаляли). Для анализа эффекта добавления веществ после инфицирования в часть лунок исследуемые вещества добавляли (декстран, олигодекстран) через 20 часов после добавления вируса. (Предполагали, что если декстран блокирует эндоцитоз вируса, его добавление не повлияет на уже захваченный в клетки вирус.) Через 2 или 24 часа после заражения

культуральную среду удаляли. Для анализа количества вируса внутри и на поверхности клетки трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере. Для анализа количества вируса внутри клеток их отмывали в фосфатно-солевом буфере, трипсинизировали, инактивировали трипсин средой с 10% сывороткой, и дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере. Затем клеточную суспензию лизировали раствором TRI reagent или TRIzol и замораживали для хранения при -20°C . После этого выделяли РНК, получали кДНК и проводили ПЦР для количественного определения РНК вируса в клетках.

Влияние декстранов на цитокиновый ответ на микобактерии in vitro

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом Новосибирского научно-исследовательского института туберкулёза МЗ РФ, образцы крови получены от здорового добровольца, подписавшего лист информированного согласия, включая согласие на работу с персональными данными. Работу с микобактериями туберкулеза проводили в лаборатории биологической безопасности 3 уровня (Новосибирский НИИ Туберкулеза) в соответствии с инструкцией по организации работ с возбудителями III – IV групп патогенности. Макрофаги получали из моноцитов крови здорового добровольца по описанному протоколу. В часть лунок добавляли исследуемые вещества декстран, олигодекстран и маннозу в итоговой концентрации 0,5% (76 мкМ, 9 мМ и 28 мМ соответственно). Через 30 минут проводили либо заражение клеток введением 2,5 млн КОЕ *M. tuberculosis* штамма H37Rv или *M. bovis* БЦЖ в 50 мкл среды, либо добавление 10 $\mu\text{g/ml}$ маннозилированного липоарабиноманнана (ManLAM). Через 1 и 7 дней культуральная жидкость была собрана и заморожена при -20°C , затем проводили иммуноферментный анализ для определения ИФН- γ и ИЛ-10.

Влияние декстрана на цитокиновый ответ на микобактерии in vivo

Лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv инактивировали теплом при температуре $+70^{\circ}\text{C}$ в течение 2 часов, контроль полной инактивации провели через 45 суток. Затем животным с подтвержденным статусом SPF, самцам мыши линии BALB/c в возрасте 6 недель ($n=3-9$) интраназально в объеме 20 мкл ввели суспензию инактивированных микобактерий $50 \cdot 10^6/\text{мл}$ в физиологическом растворе (1 млн КОЕ на животное) (группа 1, $n=8$) или аналогичную суспензию, содержащую 4% Декстран-60 (67 мкМ) (группа 2, $n=9$). Олигодекстран не тестировали по результатам работ *in vitro*. В качестве контроля брали мышей, получающих 4% Декстран-60 ($n=7$), физраствор ($n=3$) и раствор Tween 80 ($n=4$), применявшийся для предотвращения слипания микобактерий в суспензиях. Через 48 часов после введения бактерий животным была проведена эвтаназия, взятие крови, взятие и взвешивание частей легких (для нормирования результатов ИФА), их заморозка. Части легких

перед анализом гомогенизировали и центрифугировали, в супернатанте методом ИФА измеряли концентрации ИФН- γ и ИЛ-10. Срок 48 часов выбран на основании работ [239, 240].

2.2. Используемые в работе культуры клеток, животные и патогены

В работе использовали линии человеческих В лимфоцитов В-ТНР-1 и В-ТНР-1/DC-SIGN [234], а также макрофаги, полученные из моноцитов крови человека (стандартная методика получения на основе [192, 235-237]). Для взятия крови получали информированное согласие. В эксперимент *in vivo* были взяты самцы мыши линии BALB/c в возрасте 6 недель, полученные из вивария ЦКП «SPF-виварий» Института Цитологии и Генетики СО РАН.

В работе использовали псевдовирус ВИЧ (далее просто вирус) полученный в клетках НЕК 293Т из плазмиды pNL4-3.LUC.R-E- (не содержит белок env) и плазмиды, кодирующей белок env вируса штамма BaL.01, способом описанным ранее [233]. В моделях туберкулеза использовали лабораторные штаммы *M. tuberculosis* H37Rv и *M. bovis* BCG (микробиологическая лаборатория Новосибирского НИИ Туберкулеза). Убитые теплом (2 часа при +60°C) микобактерии туберкулеза H37Rv тестировали на отсутствие роста на питательной среде в течение 45 суток (микробиологическая лаборатория Новосибирского НИИ Туберкулеза).

2.3. Используемые в работе реагенты

В работе использовали реагенты: буфер HBS-P, содержащий 0.01 М HEPES pH 7.4, 0.15 М NaCl, 0.005% v/v сурфактант P20 (GE Healthcare, США); сурфактант P20 (GE Healthcare, США) (Sigma Aldrich, США); маннозилированный бычий сывороточный альбумин, BSA-Man (Dextra Laboratories, Великобритания); бычий сывороточный альбумин (BSA), этилендиаминтетрауксусная кислота, трис(гидроксиметил)аминометана (Трис), соляная кислота, хлорид кальция, хлорид натрия, 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), N-Гидроксисукцинимид (NHS) (Sigma Aldrich, США); внеклеточный домен рецептора DC-SIGN [232]; линейный декстран со средней молекулярной массой 66 000 (MP Biomedicals, США), далее D66; препарат декстрана Полиглюкин, 6% раствор клинического декстрана со средней молекулярной массой 60 000 (ОАО «Биохимик», Россия), далее D60; олигодекстран (смесь изомальтоолигосахаридов со средней молекулярной массой 560) (пищевая добавка Vita Fiber, BioNeutra, Канада), далее D06; манноза (Applichem, Германия), Tween 80 (Serva, Германия и Applichem, Германия); маннозилированный липоарабиноманнан стенки микобактерий туберкулеза H37Rv (Bei Resources, США); культуральная среда RPMI 1640 (Биолот, Россия и Life technologies, США), раствор глутамина (Биолот, Россия); раствор Glutamax (Life technologies, США); раствор Pen/Strep или пенициллин-стрептомицин (Life

technologies, США и Биолот, Россия); фетальная сыворотка коров (Life technologies, США; ICN, США и Биолот, Россия); фиколл плотностью 1,077 г/мл (Биолот, Россия); PBS фосфатно-солевой буфер (Life technologies, США и Биолот, Россия); трипановый синий, сухой (Sigma Aldrich, США); DMSO диметилсульфоксид уровня очистки "для клеточных работ" (Sigma Aldrich, США); TRI reagent (Sigma-Aldrich, США); TRIzol (Life Technologies, США); бромохлоропропан (Sigma-Aldrich, США); хлороформ (Sigma-Aldrich, США); этиловый и изопропиловый спирты (Sigma-Aldrich, США); вода свободная от РНКаз (Life technologies, США), трипсин (Life technologies, США).

В работе использовали наборы реагентов: наборы для проведения реакции обратной транскрипции QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, США) и qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta BioSciences, США); набор для проведения реакции ПЦР в реальном времени Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, США); наборы для проведения иммуноферментного анализа концентрации: человеческих ИФН- γ и ИЛ-10 (Вектор-Бест, Россия), мышиных ИФН- γ (LEGEND MAX Mouse IFN- γ ELISA Kit) и ИЛ-10 (аналогичный набор для определения ИЛ-10) (BioLegend, США).

2.4. Методы работы с культурами клеток

2.4.1. Культивирование клеток В-ТНР-1 и В-ТНР-1/DC-SIGN

В работе использовали линии человеческих В лимфоцитов В-ТНР-1 и В-ТНР-1/DC-SIGN [234]. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением глутамина, антибиотиков и фетальной сыворотки коров в среде 5% углекислого газа при температуре 37°C. Для посева суспензию клеток в культуральном флаконе, рассчитанном на объем среды 10-75 мл, гомогенизировали путем пипетирования, клетки считали в счетной камере. После забора необходимого количества клеток в эксперимент, часть клеток для следующего опыта оставляли и добавляли необходимое количество свежей среды.

Для замораживания готовили культуру клеток в фазе экспоненциального роста. Клеточную суспензию гомогенизировали и основную часть клеток осаждали центрифугированием. 10 мкл суспензии использовали для определения жизнеспособности и количества клеток с помощью счетной камеры. Исходя из числа клеток готовили среду для заморозки. Среда состояла из 45% свежей среды, 10% DMSO и добавляемых после окончания центрифугирования 45% использованной клеточной среды (супернатант). Лишний супернатант удаляли, и ресуспендировали клеточный осадок в среде для заморозки с получением суспензии клеток с концентрацией 5 млн/мл. Затем по 1 мл суспензии переносили в криопробирки.

Криопробирки оставляли на 2 часа при -20°C , затем хранили 24 часа при -80°C , после чего переносили на сухом льду в хранилище с жидким азотом.

Для разморозки клеток криопробирки доставали из жидкого азота и быстро перемещали нижнюю часть пробирок в водяную баню при 37°C . Наполовину размороженную пробирку переносили в ламинарный шкаф, обильно обрабатывали 70% спиртом и ждали высыхания, добавляли к суспензии 1 мл теплой свежей среды, аккуратно пипетировали и переносили в согретый до 37°C культуральный флакон со свежей средой; перемешивали качанием. Затем 10 мкл суспензии брали для определения жизнеспособности и количества клеток в счетной камере. Центрифугировали клетки не ранее, чем через 12 часов после разморозки.

2.4.2. Получение мононуклеарных клеток периферической крови и макрофагов

Для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) у здорового добровольца из локтевой вены получали свежую кровь, к которой в качестве антикоагулянта был добавлен 0,5 М раствор ЭДТА (80 мкл на 10 мл). Кровь разбавляли RPMI 1640 в соотношении 1:1. Смесь наслаивали на фиколл 3:1, после чего центрифугировали в течение 30 минут при 300 g. После центрифугирования удаляли верхний слой (плазму), не повредив интерфазу (мононуклеары). Затем аккуратно собирали интерфазный слой и переносили в новую пробирку. Клетки интерфазы дважды промывали, центрифугируя в 10 мл охлажденной среды RPMI-1640 при 300 g в течение 10 мин. Затем ресуспендировали клетки в 1 мл среды RPMI-1640 и определяли концентрацию и жизнеспособность МПК в счетной камере, смешивая 1:1 клеточную суспензию и 0,4% раствор трипанового синего.

Для получения макрофагов суспензию МПК на основе среды RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки коров в концентрации 5 или 7,5 млн/мл высевали в количестве 0,5 мл в лунки 24-луночного планшета. Через 2 часа инкубации в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°C неадгезированные клетки удаляли, дважды отмывая монослой средой RPMI-1640. Затем в лунки добавляли RPMI с 2 мМ глутамина, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% фетальной сыворотки коров, после чего инкубировали 5 суток в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°C . После 5 суток инкубации основная часть клеток приобретала полигональную форму с расплыванием, характерным для макрофагов. Выбор срока инкубации и компонентов среды основан на работах [192, 235-237].

2.5. Методы работы с экспериментальными животными

Работу с животными вели в условиях SPF-вивария (ЦКП «SPF-виварий» Института Цитологии и Генетики СО РАН). В эксперимент были взяты 31 самец BALB/c в возрасте 6 недель. Протокол исследования соответствовал положениям «Европейской конвенции о защите

позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). В работе использовали методы: интраназальное введение препаратов, эвтаназия с помощью CO₂-камеры, получение крови путем декапитации животных. Для получения плазмы кровь инкубировали при температуре +4°C в течение 16 часов и отбирали прозрачный верхний слой жидкости. Для взятия легких животное вскрывали вдоль белой линии, разрезали ножницами грудную клетку и пинцетом доставали орган, после чего отделяли часть органа весом около 0,07 г и помещали в 1,5 мл пробирку. Плазму и части легких животных хранили при -20°C до проведения иммуноферментного анализа (ИФА). Перед ИФА легкие гомогенизировали с 200 мкл фосфатно-солевого буфера в пробирках индивидуальными пластиковыми пестиками и центрифугировали, после чего проводили анализ супернатанта.

2.6. Выделение РНК и получение кДНК

Для выделения РНК использовали TRI Reagent или TRIzol в соответствии с протоколами производителей. Образец хранили при -20°C не более 3 месяцев, лизировали исходными реагентами (TRI Reagent или TRIzol), после инкубации добавляли ВСП или хлороформ и перемешивали активным встряхиванием. После инкубации центрифугировали и отбирали в чистые пробирки прозрачную фазу, содержащую РНК. Затем к этой фазе добавляли изопропанол для осаждения РНК. Центрифугировали, и аккуратно удаляли супернатант, чтобы не повредить (если он прикреплен к стенке) и не потерять (если он не прикреплен к стенке) осадок. Затем осадок промывали 75% этанолом (добавляли этанол, центрифугировали, удаляли этанол) и высушивали в твердотельном термостате 5-10 минут при температуре 60°C. После этого РНК растворяли в воде, свободной от РНКаз и хранили при -80°C. Также использовали набор для выделения ДНК/РНК "Проба-НК" (ДНК-технология, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Препарат НК хранили при -80°C или при -20°C не более суток.

Для получения кДНК использовали QuantiTect Reverse Transcription Kit или qScript™ cDNA Synthesis Kit в соответствии с протоколами производителей. Кратко в случае первого набора 10 мкл раствора РНК были соединены с 2 мкл воды, свободной от РНКаз и 2 мкл буфера для расщепления геномной ДНК (содержащего ДНКазу), и инкубировались 2 минуты при 42°C. Затем в раствор добавляли смесь обратной транскриптазы, буфера для обратной транскрипции и праймеров для обратной транскрипции, после чего инкубировали 15 минут при 42°C, и еще 3 минуты при 95°C для инактивации обратной транскриптазы. В случае второго набора 10 мкл РНК соединяли с 5 мкл воды, свободной от РНКаз и 5 мкл смеси обратной транскриптазы и реакционной смеси (буфер, содержащий ДНКазу, и праймеры). Все вместе инкубировали 5 минут при 22°C, 30 минут при 42°C, и еще 5 минут при 85°C. кДНК хранили при -20°C.

2.7. ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени выполняли на приборах ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, США) и CFX96 (Biorad, США). Для амплификации кДНК использовали праймеры согласно Таблице 4 (*gag* — ген ВИЧ-1, остальные — гены человека).

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Мишень	Праймер 1, от 5' к 3'	Праймер 2, от 5' к 3'	
<i>Gag</i>	CTAGAACGATTCGCAGTTAATCCT	STATCSTTTGATGCACACAATAGAG	[241]
<i>GAPDH</i>	CCTTAAACAGGCCCACTTGA	CCTTCCACAATGCCAAAGTT	[242]
<i>ACTB</i>	TCCTGTGGCATCCACGAAACT	GAAGCATTTGCGGTGGACGAT	[243]
<i>IFNG</i>	TCAGCTCTGCATCGTTTTGG	GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA	[244]
<i>IL10</i>	GAGATGCCTTCAGCAGAGTG	GAGATGCCTTCAGCAGAGTG	[245]
<i>TGFB1</i>	CAGCAACAATTCCTGGCGATA	AAGGCGAAAGCCCTCAATTT	[244]

Общий объем реакции составлял 10 или 25 мкл, включая 5 или 12,5 Power SYBR Green PCR Master Mix, по 1 или 2 мкл каждого из праймеров (итоговая концентрация 0,3 мкМ), 2 мкл кДНК и деионизованную воду до полного объема. Реакцию амплификации проводили согласно следующего протокола: 95°C в течение 10 мин, далее 40 циклов (95°C в течение 15 сек, 60°C в течение 1 мин), построение кривой плавления. Эффективность реакций при работе с продуктами генов *gag* и *GAPDH* составляла не менее 98% по данным прибора. Эффективность реакции для каждой пары остальных праймеров рассчитывали, анализируя по 5 последовательных десятикратных разведений соответствующих ампликонов в ПЦР при стандартных условиях (Рисунок 6).

Каждый образец, включая отрицательные контроли, анализировали дважды; специфичность продукта реакции всегда контролировали по кривой плавления. Установку параметров ПЦР проводили в программах 7300 System SDS RQ Study Software и CFX Manager 3.0. В этих же программах контролировали кривые плавления (удаляя из анализа результаты лунок, в которых наблюдалось накопление неспецифичного продукта), устанавливали threshold вручную и экспортировали файл со значениями *St* для каждой лунки.

Результаты ПЦР обрабатывали в программе Microsoft Excel. При отсутствии одного значения *St*, его не брали в анализ; при отсутствии двух значений их заменяли в расчетах на значение 40, оценивая количество продукта реакции как близкое к нулевому. При работе с продуктами генов *gag* и *GAPDH* пользовались упрощенным методом расчетов $\Delta\Delta C_t$ ($E=2$), при работе с продуктами остальных генов пользовались методом Пфаффа [246]. Полученные значения соотношений продукции генов использовали для статистического анализа.

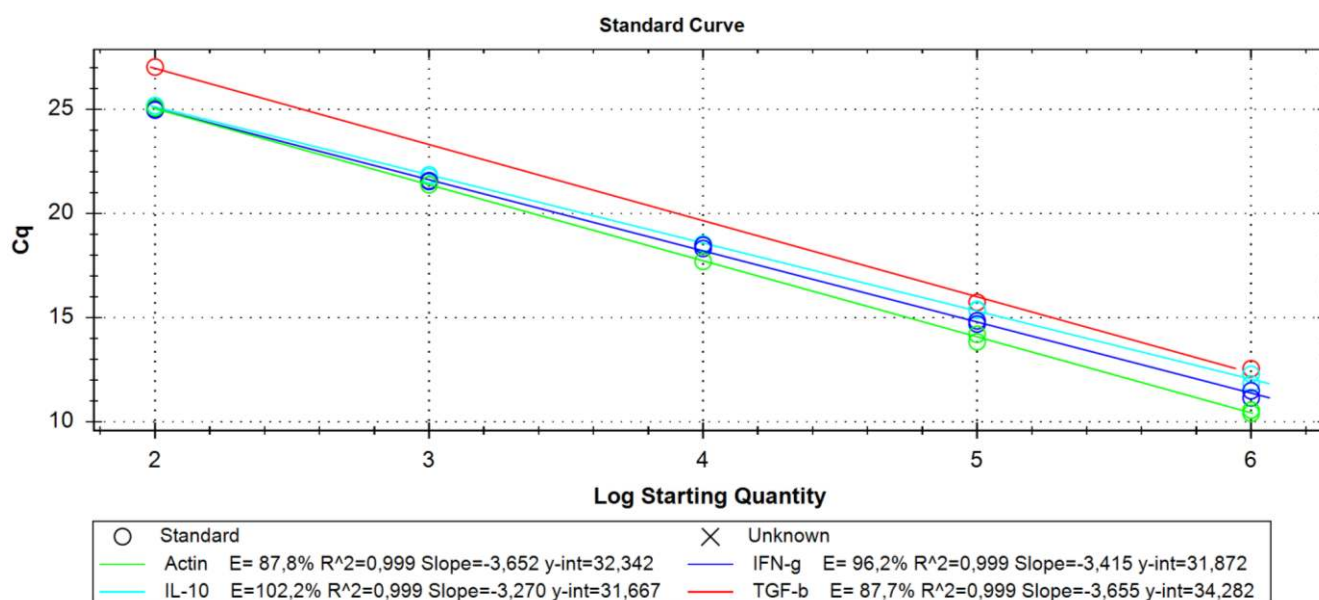


Рисунок 6. Калибровочные графики и данные расчета эффективности реакций

2.8. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ проводили в соответствии с протоколами производителя. Готовили разведения рекомбинантных белков (положительный контроль) с известной концентрацией. Вводили в лунки растворитель, анализируемые образцы (обычно, дублируя), отрицательный контроль и полученные разведения с известной концентрацией. Ставили планшет на шейкер при 37°C на 2 часа, затем 3-4 раза отмывали буфером для отмывки. Затем вводили в лунки первое антитело, ставили на шейкер на 1 час, отмывали. Вводили второе антитело, ставили на шейкер на 30 минут, отмывали. Далее добавляли реагент ТМБ, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и оставляли на 15 минут. Затем добавляли стоп-реагент и определяли оптическую плотность на длине волны 450 нм, вычитая референсное поглощение на длине волны 650 нм. Все определения проводили в дубликатах. Между используемыми наборами были небольшие различия (время и температура инкубации на шейкере, объем и количество повторов при отмывке, время работы фермента).

Результаты ИФА обрабатывали в программе Microsoft Excel. Строили калибровочный график, и по формуле, определяемой программой, пересчитывали значения в концентрации. Далее полученные значения использовали для статистического анализа.

2.9. Статистическая обработка

По значениям, полученным в результате ИФА и ПЦР анализа образцов, полученных *in vitro*, рассчитывали средние значения и стандартные отклонения. Значимость статистических различий оценивали при помощи парного Т-теста Стьюдента.

Применение Т-теста Стьюдента без анализа характера распределения это стандартный подход при работе с клеточными линиями и первичными культурами клеток, полученными от одного донора, так как биологическое число повторов N неизменно и равно 1, а все повторы являются техническими (в разделе «дизайн исследований» для задач 2 и 3 в качестве N указано количество повторов эксперимента). Стандартные отклонения в данном случае характеризуют воспроизводимость результатов между повторами и точность методов измерения.

При анализе влияния декстрана на значение соотношения ИФН- γ /ИЛ-10 помимо Т теста Стьюдента использовали байесову статистику, а именно, использовали значение t статистики (в программе GraphPad) для расчета фактора Байеса K (расчет проводили в онлайн-калькуляторе <http://pcl.missouri.edu/bayesfactor>, значение $scale\ r=0.707$). Значения K больше 0 считали свидетельствующими в пользу альтернативной гипотезы (наличие различий между группами).

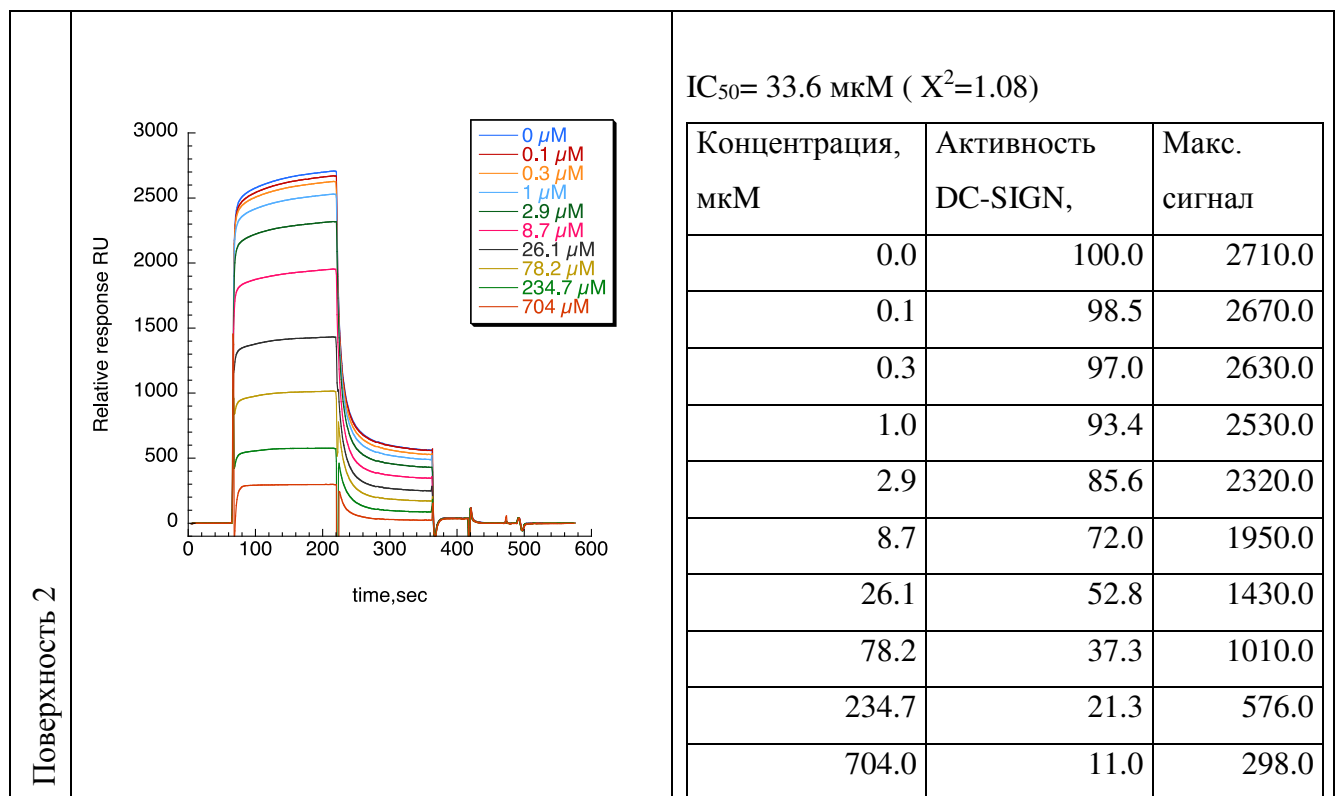
Для эксперимента *in vivo* рассчитывали средние значения, медианы, границы 1 и 3 квартилей, максимальные и минимальные значения для каждой группы. Крайние значения включали в анализ, но не показывали на диаграммах при выходе за пределы шкалы. Если значение концентрации ИЛ-10 составляло менее 2,7 пг/мл (предел определения теста), для вычисления частного ИФН- γ /ИЛ-10 использовали значение ИЛ-10 равное 2,7 пг/мл (решение проблемы деления на 0, оценка значения соотношения "снизу"). Различия между парами групп оценивали по U-критерию Манна-Уитни с уровнем значимости $\alpha=0,05$. Для проведения расчетов использовали программу Microsoft Excel.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Влияние декстранов на связывание DC-SIGN с остатками маннозы

Задача: исследовать конкурентное ингибирование рецептора DC-SIGN декстраном и олигодекстраном методом поверхностного плазмонного резонанса

Декстран D66 дозозависимо ингибировал связывание внеклеточного домена DC-SIGN с маннозилированным БСА, связанным с поверхностью чипа (Рисунок 7). Параметр IC_{50} рассчитывали 4-параметрическим логарифмическим логистическим методом, встроенным в программу обработки данных.



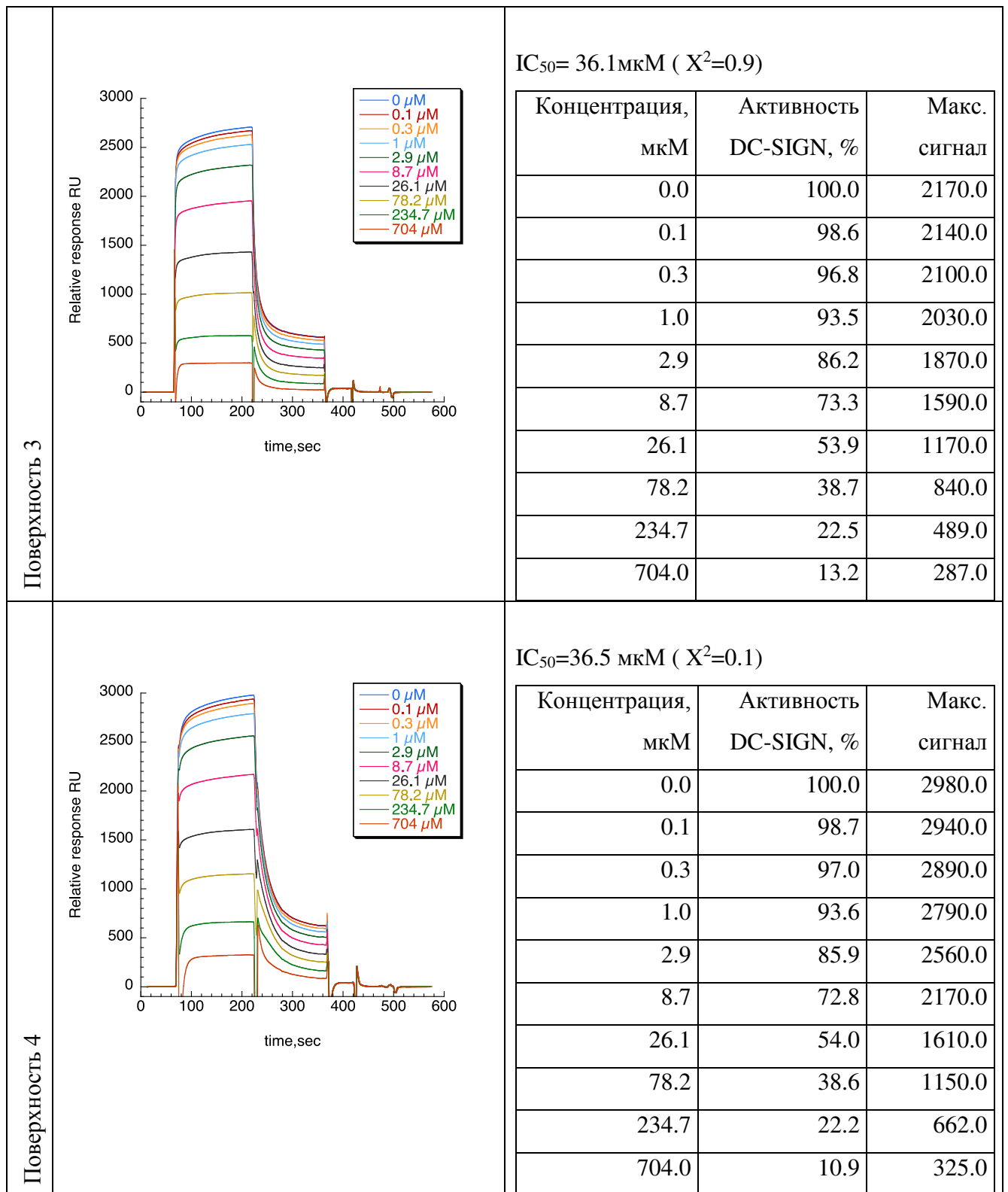
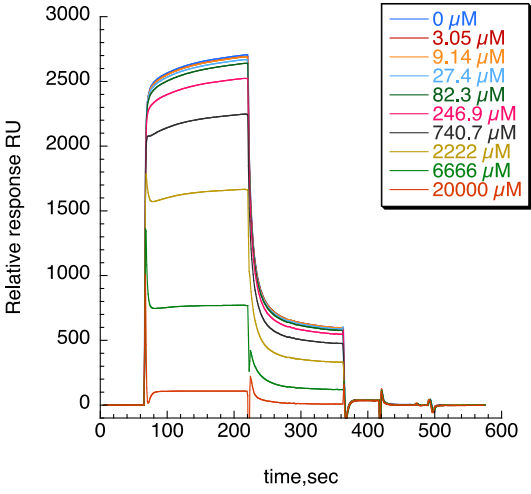
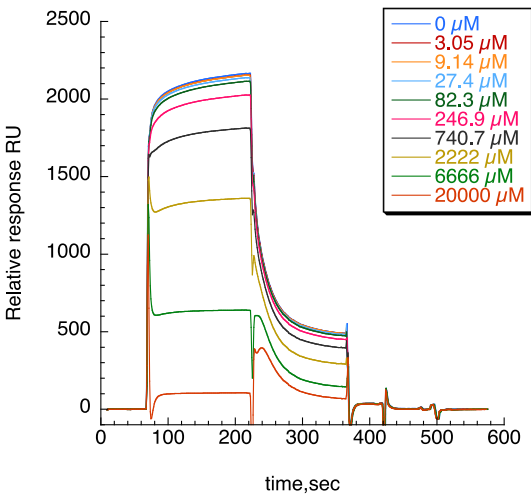


Рисунок 7. Сенсограммы ингибирования связывания DC-SIGN с БСА-Ман декстраном и расчет значений IC₅₀

Олигодекстран D06 также дозозависимо ингибировал связывание внеклеточного домена DC-SIGN с маннозилированным БСА, связанным с поверхностью чипа (Рисунок 8). Параметр

IC₅₀ рассчитывали 4-параметрическим логарифмическим логистическим методом, встроенным в программу обработки данных.

Поверхность 2		<p>IC₅₀= 3290 мкМ (X²=0.3)</p> <table border="1" data-bbox="868 427 1505 1104"> <thead> <tr> <th>Концентрация, мкМ</th> <th>Активность DC-SIGN, %</th> <th>Макс. сигнал</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>100.0</td><td>2700</td></tr> <tr><td>3.05</td><td>99.6</td><td>2690</td></tr> <tr><td>9.14</td><td>99.6</td><td>2690</td></tr> <tr><td>27.43</td><td>98.9</td><td>270</td></tr> <tr><td>82.3</td><td>97.8</td><td>2640</td></tr> <tr><td>246.91</td><td>93.3</td><td>2520</td></tr> <tr><td>740.74</td><td>83.3</td><td>2250</td></tr> <tr><td>2222.22</td><td>61.9</td><td>1670</td></tr> <tr><td>6666.67</td><td>28.5</td><td>770</td></tr> <tr><td>20000</td><td>4.0</td><td>108</td></tr> </tbody> </table>	Концентрация, мкМ	Активность DC-SIGN, %	Макс. сигнал	0	100.0	2700	3.05	99.6	2690	9.14	99.6	2690	27.43	98.9	270	82.3	97.8	2640	246.91	93.3	2520	740.74	83.3	2250	2222.22	61.9	1670	6666.67	28.5	770	20000	4.0	108
Концентрация, мкМ	Активность DC-SIGN, %	Макс. сигнал																																	
0	100.0	2700																																	
3.05	99.6	2690																																	
9.14	99.6	2690																																	
27.43	98.9	270																																	
82.3	97.8	2640																																	
246.91	93.3	2520																																	
740.74	83.3	2250																																	
2222.22	61.9	1670																																	
6666.67	28.5	770																																	
20000	4.0	108																																	
Поверхность 3		<p>IC₅₀= 3420 мкМ (X²=0.3)</p> <table border="1" data-bbox="868 1211 1505 1886"> <thead> <tr> <th>Концентрация, мкМ</th> <th>Активность DC-SIGN, %</th> <th>Макс. сигнал</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.0</td><td>100.0</td><td>2160.0</td></tr> <tr><td>3.1</td><td>99.5</td><td>2150.0</td></tr> <tr><td>9.1</td><td>99.5</td><td>215.0</td></tr> <tr><td>27.4</td><td>99.1</td><td>2140.0</td></tr> <tr><td>82.3</td><td>97.7</td><td>2110.0</td></tr> <tr><td>246.9</td><td>94.0</td><td>2030.0</td></tr> <tr><td>740.7</td><td>83.8</td><td>1810.0</td></tr> <tr><td>2222.2</td><td>63.0</td><td>1360.0</td></tr> <tr><td>6666.7</td><td>29.6</td><td>639.0</td></tr> <tr><td>20000.0</td><td>4.9</td><td>106.0</td></tr> </tbody> </table>	Концентрация, мкМ	Активность DC-SIGN, %	Макс. сигнал	0.0	100.0	2160.0	3.1	99.5	2150.0	9.1	99.5	215.0	27.4	99.1	2140.0	82.3	97.7	2110.0	246.9	94.0	2030.0	740.7	83.8	1810.0	2222.2	63.0	1360.0	6666.7	29.6	639.0	20000.0	4.9	106.0
Концентрация, мкМ	Активность DC-SIGN, %	Макс. сигнал																																	
0.0	100.0	2160.0																																	
3.1	99.5	2150.0																																	
9.1	99.5	215.0																																	
27.4	99.1	2140.0																																	
82.3	97.7	2110.0																																	
246.9	94.0	2030.0																																	
740.7	83.8	1810.0																																	
2222.2	63.0	1360.0																																	
6666.7	29.6	639.0																																	
20000.0	4.9	106.0																																	

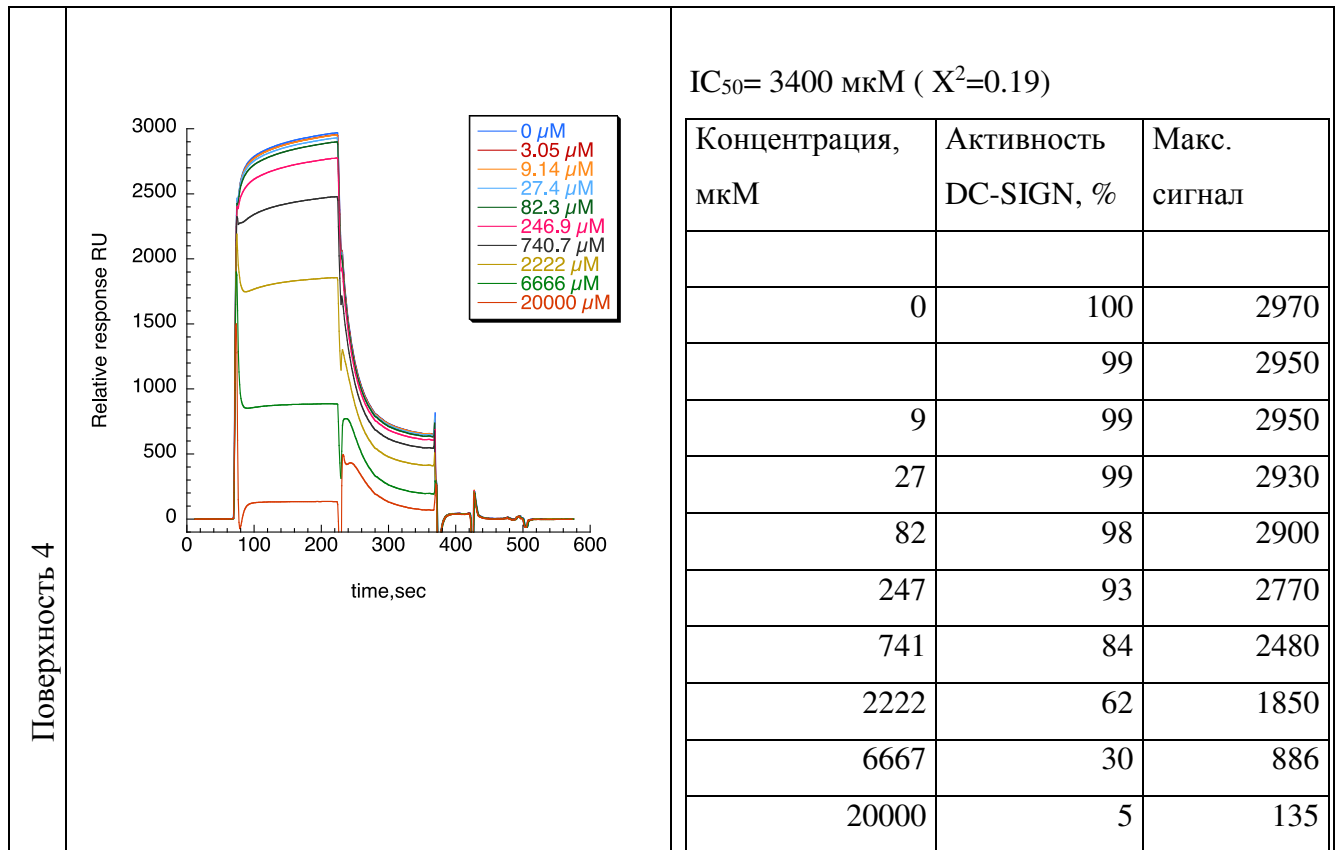


Рисунок 8. Сенсограммы ингибирования связывания DC-SIGN с BCA-Man олигодекстраном и расчет значений IC_{50}

Таким образом, оба соединения дозозависимо ингибировали связывание между внеклеточным доменом DC-SIGN и BCA-Man (Рисунок 7, 8). Кривые ингибирования для соединений выглядят подобным образом для разных использованных в эксперименте поверхностей (Рисунок 9).

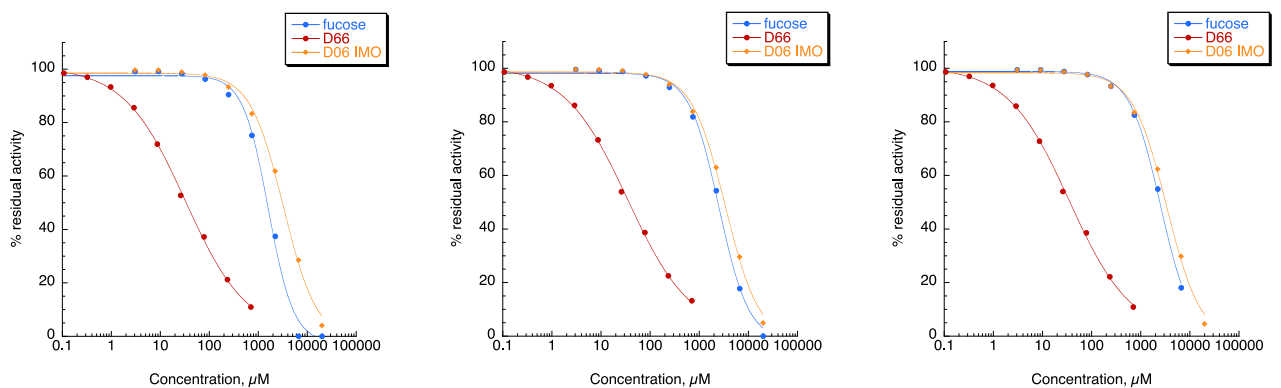


Рисунок 9. Кривые ингибирования DC-SIGN, построенные для фукозы, декстрана и олигодекстрана на трех поверхностях с иммобилизованным BCA-Man (2, 3 и 4 слева направо)

На основании кривых ингибирования (Рисунок 9) были вычислены значения IC_{50} для D66 и D06. Аффинность молекул олигодекстрана D06 ($IC_{50} = 4.1$ мМ) к рецептору DC-SIGN была сопоставима с аффинностью D-маннозы ($IC_{50} = 3.1$ мМ) и фукозы ($IC_{50} = 2.5$ мМ) (Таблица 5).

Таблица 5. IC_{50} в молярной и массовой концентрации или в % отношении масса/объем

	$IC_{50} \pm SD$, мкМ	IC_{50} , мг/мл	IC_{50} , м/о %
L-фукоза	2480.0 ± 17.3	0.40	0.04
D-манноза	3057.0 ± 66.0	0.55	0.05
D06	4070.0 ± 70.0	2.03	0.20
D66	35.4 ± 1.6	2.33	0.23

Связывание декстрана D66 с DC-SIGN было намного сильнее, а ингибирование взаимодействия DC-SIGN/BCA-Map на 50% достигалось с использованием примерно в 100 раз меньшей дозы ($IC_{50} = 35,4$ мкМ), по сравнению с олигодекстраном D06 ($IC_{50} = 4,1$ мМ, Таблица 5). Можно отметить, что в состав D66 входит примерно в 100 раз больше глюкозных остатков, чем в состав D06. Таким образом, ингибиторный потенциал IC_{50} , выраженный в массе по отношению к объему (IC_{50} м/о), для декстрана и олигодекстрана сопоставим.

3.2. Влияние декстранов на DC-SIGN-зависимый эндоцитоз ВИЧ

Задача: исследовать влияние декстрана и олигодекстрана на DC-SIGN-зависимый эндоцитоз ВИЧ-1 в клетках линии В-ТНР-1/DC-SIGN

В клетках, не экспрессирующих DC-SIGN (В-ТНР-1), захват вируса не наблюдался (Рисунки 10, 11). Инкубация клеток В-ТНР-1, экспрессирующих рецепторы DC-SIGN (В-ТНР-1/DC-SIGN), с псевдовиральными частицами ВИЧ-1 приводила к связыванию вирусных частиц на поверхности клеток и эндоцитозу (Рисунки 10, 11), но не репликации вируса (в этих клетках ВИЧ остается во фракции внутриклеточных везикул и не реплицируется, см. п. 4.4.3). Активность связывания и захвата вируса анализировали по накоплению РНК вирусного гена *gag*, ассоциированного с интактными и трипсинизированными клетками (для измерения количества вируса внутри клеток). Трипсинизацию клеток проводили в 2 экспериментах (Рисунок 11), количество вируса, связанного с поверхностью клеток, составляло от 31 до 75% от общего числа вирусных частиц, ассоциированных с клетками. При инкубации с вирусом в течение 24 часов в контроле на поверхности находилось 39% вируса, при преинкубации с декстраном 31% вируса.

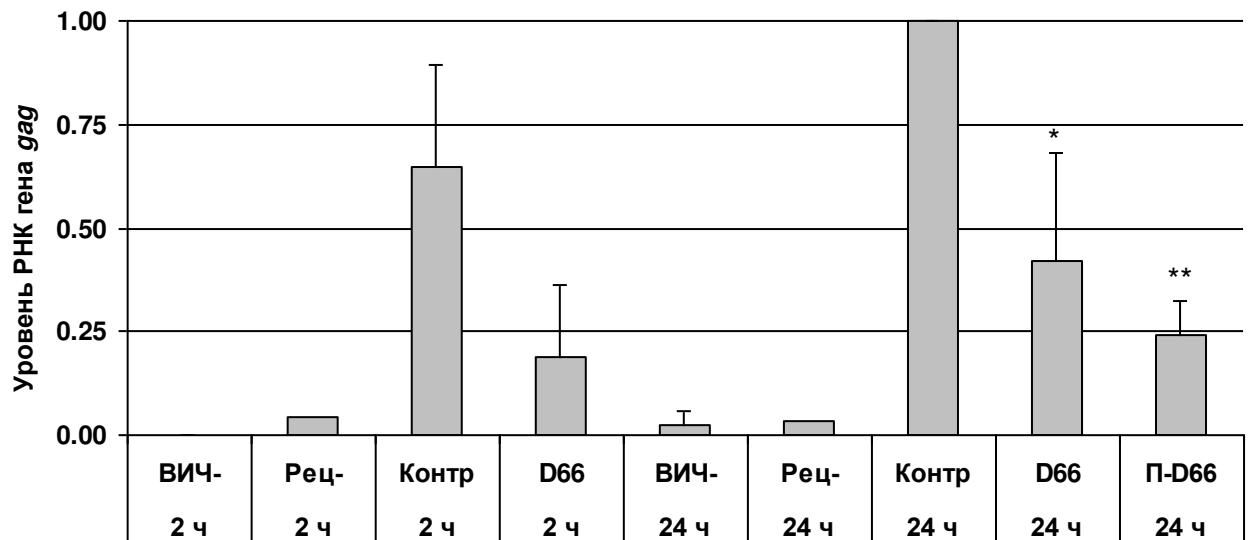


Рисунок 10. Влияние декстрана на захват и связывание ВИЧ клетками В-ТНР-1, экспрессирующими и не экспрессирующими рецептор DC-SIGN

Примечание. ВИЧ- — незараженные клетки, Рец- — зараженные клетки В-ТНР-1, Контр — зараженные клетки В-ТНР-1/DC-SIGN. D66 — зараженные клетки В-ТНР-1/DC-SIGN, инкубированные с 0,5% декстраном, П-D66 — зараженные клетки В-ТНР-1/DC-SIGN с добавлением 0,5% декстрана через 20 часов. Образцы получены через 2 или 24 часа после заражения. По оси ординат количество РНК гена *gag* выражено в относительных единицах по отношению к принятому за 1 количеству копий РНК этого гена в клетках В-ТНР-1/DC-SIGN через 24 часа после заражения. Значимость статистических различий проверена Т тестом Стьюдента. * — $P = 0.09$, ** — $P < 0.01$. Приведены данные двух независимых экспериментов (кроме образцов Рец-)

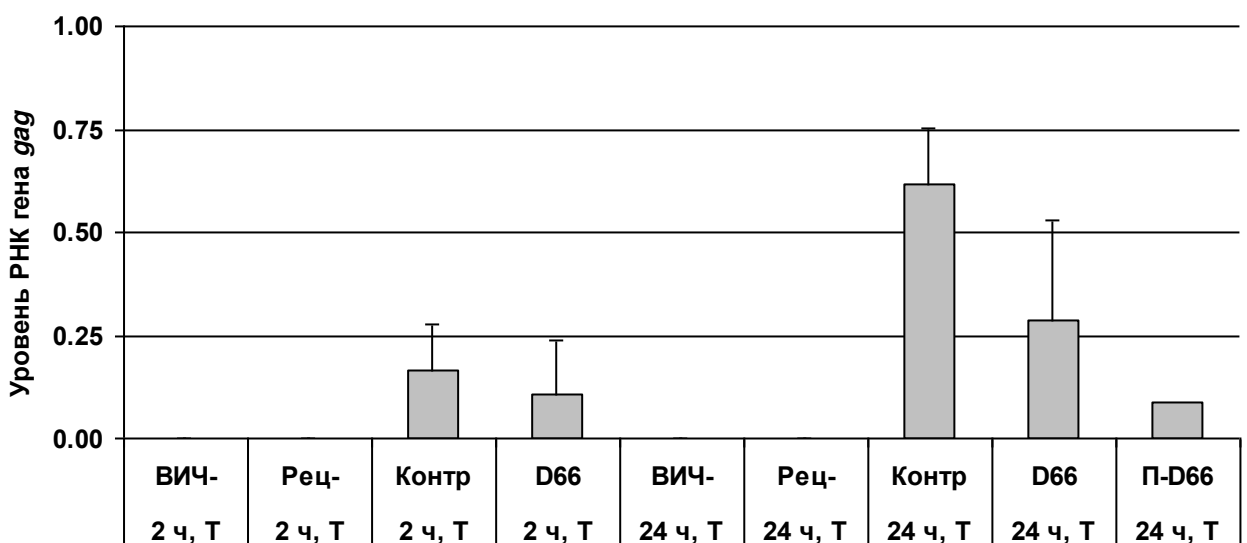


Рисунок 11. Влияние декстрана на внутриклеточный захват ВИЧ клетками В-ТНР-1, экспрессирующими и не экспрессирующими рецептор DC-SIGN

Примечание. ВИЧ- — незараженные клетки, Рец- — зараженные клетки В-ТНР-1, Контр — зараженные клетки В-ТНР-1/DC-SIGN. D66 — зараженные клетки В-ТНР-1/DC-SIGN, инкубированные с 0,5% декстраном, П-D66 — зараженные клетки В-ТНР-1/DC-SIGN с добавлением 0,5% декстрана через 20 часов. Образцы получены через 2 или 24 часа после заражения, клетки трипсинизированы (Т). По оси ординат количество РНК гена *gag* выражено в относительных единицах по отношению к принятому за 1 количеству копий РНК этого гена в клетках В-ТНР-1/DC-SIGN через 24 часа после заражения. Приведены данные двух независимых экспериментов (кроме образца П-D66)

Преинкубация клеток В-ТНР-1/DC-SIGN в течение 30 минут с 0,5% декстрана со средней молекулярной массой 66 000 с последующим добавлением частиц ВИЧ в 2,4 раза снижала численность вируса, ассоциированного с клетками ($P=0,09$). Эта зависимость наблюдалась как на ранних (2 часа), так и на поздних сроках после заражения (24 часа) (Рисунок 10). Подобная зависимость обнаруживается и относительно численности вируса внутри клеток, которые были трипсинизированы перед выделением РНК (Рисунок 11). Добавление декстрана до заражения снижало количество ВИЧ ~ в 2 раза внутри клеток и ~ в 3 раза на их поверхности. Следовательно: 1) интернализация ВИЧ в клетках В-ТНР-1 эффективна только в случае экспрессии ими рецептора DC-SIGN (Рисунки 10, 11); 2) снижение эндоцитоза ВИЧ клеток В-ТНР-1/DC-SIGN, инкубированных с декстраном, обусловлено ингибированием взаимодействия ВИЧ с рецептором DC-SIGN.

Чтобы исключить возможность прямого взаимодействия псевдовируса ВИЧ с декстраном, мы сначала добавили ВИЧ к клеткам, а затем, через 20 часов добавили декстран. Если бы степень связывания и захвата ВИЧ в предыдущем опыте зависела от взаимодействия вирусных частиц с декстраном в среде, то в данном случае декстран, добавленный к клеткам, которые уже связали или захватили вирус, не оказал бы никакого влияния. Однако, было показано, что декстран значительно снижал количество вирусных частиц как на поверхности (связывание), так и внутри клеток (захват), если применялся через 20 часов после заражения (Рисунки 10 и 11, образцы П-D66). Добавление декстрана через 20 часов после заражения снижало количество ВИЧ, ассоциированного с клетками ~ в 4 раза: ~ в 7 раз внутри клеток и ~ в 2,5 раза на их поверхности. Из этого можно сделать два вывода: 1) декстран способен конкурировать с ВИЧ за связывание с DC-SIGN на поверхности клеток; 2) декстран способен снижать количество вируса, уже захваченного (или вновь захваченного) внутри клеток.

Олигодекстраны (изомальтоолигосахариды) со средней молекулярной массой 560 в той же массовой концентрации также оказывали выраженный ингибирующий эффект на заражение клеток В-ТНР-1/DC-SIGN вирусом ВИЧ, снижая количество вируса, ассоциированного с клетками также в среднем в 2,4 раза ($P=0,06$) (Рисунок 12).

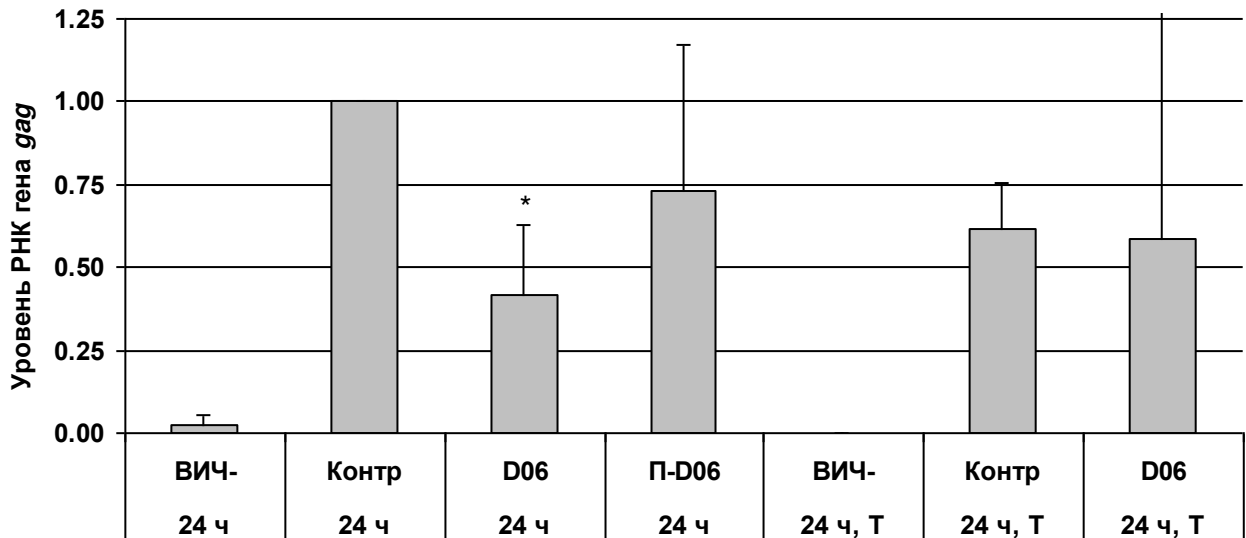


Рисунок 12. Влияние олигодекстрана на захват и связывание ВИЧ клетками В-ТНР-1/DC-SIGN

Примечание. ВИЧ- — незараженные клетки, Рец- — зараженные клетки В-ТНР-1, Контр — зараженные клетки В-ТНР-1/DC-SIGN. D06 — зараженные клетки В-ТНР-1/DC-SIGN, инкубированные с 0,5% олигодекстраном, П-D06 — зараженные клетки В-ТНР-1/DC-SIGN с добавлением 0,5% олигодекстрана через 20 часов. Образцы получены 24 часа после заражения, в части образцов клетки трипсинизированы (Т). По оси ординат количество РНК гена *gag* выражено в относительных единицах по отношению к принятому за 1 количеству копий РНК этого гена в клетках В-ТНР-1/DC-SIGN через 24 часа после заражения. Значимость статистических различий проверена Т тестом Стьюдента. * — $P = 0.06$. Приведены данные двух независимых экспериментов

Влияние декстрана и олигодекстрана на снижение захвата вируса в клетках прямо зависело от дозы (Рисунок 13), но при этом начиная с определенной дозы достигался максимальный эффект — снижение количества вируса, ассоциированного с клетками, примерно на 75%. Так, повышение концентрации выше 0,6% и 5% по массе для добавляемых в среду декстранов и олигодекстранов, соответственно, не приводило к более эффективному ингибированию захвата вирусных частиц. С учетом данных по снижению захвата ВИЧ более высокими дозами декстрана и олигодекстрана, можно утверждать, что данные соединения значимо ингибируют эндоцитоз ВИЧ, $P=0,03$ и $P=0,02$, соответственно (итого, $P<0,05$). Значения EC_{50} составили для декстранов: $EC_{50}(D66)=50$ мМ (0,33%), $EC_{50}(D06)= 5,7$ мкМ (0,57%), что хорошо согласуется с данными, полученными в бесклеточной модели.

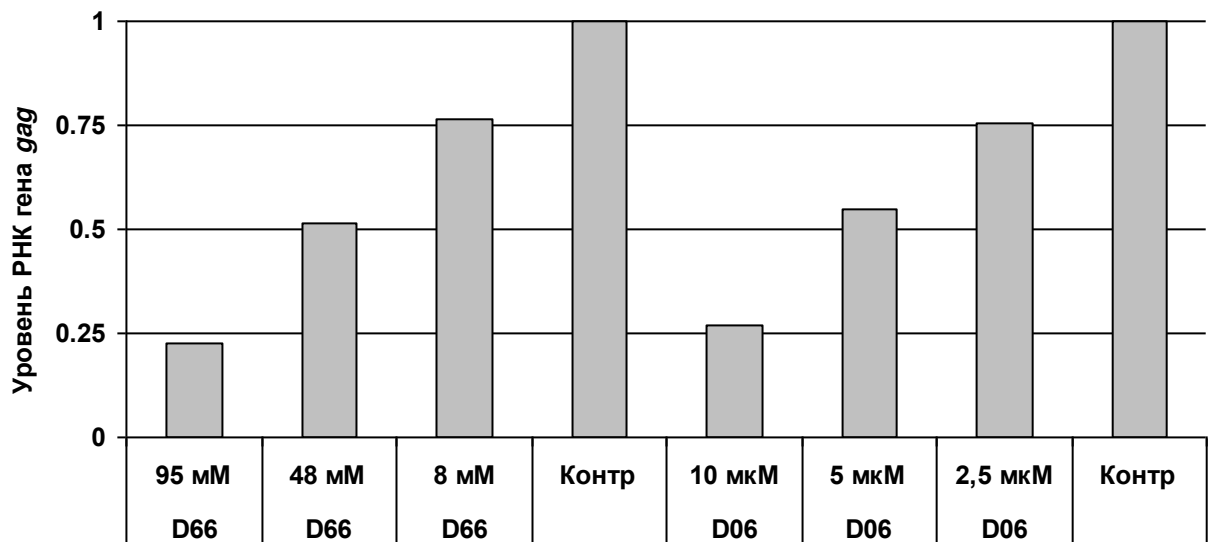


Рисунок 13. Влияние декстрана и олигодекстрана на захват и связывание ВИЧ клетками B-THP-1/DC-SIGN в зависимости от дозы

Примечание. Заражение клеток B-THP-1/DC-SIGN, инкубированных с серией разведений декстрана (D66) и олигодекстрана (D06), концентрация указана в легенде. По оси ординат количество РНК гена *gag* выражено в относительных единицах по отношению к принятому за 1 количеству копий РНК этого гена в клетках B-THP-1/DC-SIGN через 24 часа после заражения. Приведены данные одного репрезентативного эксперимента из двух

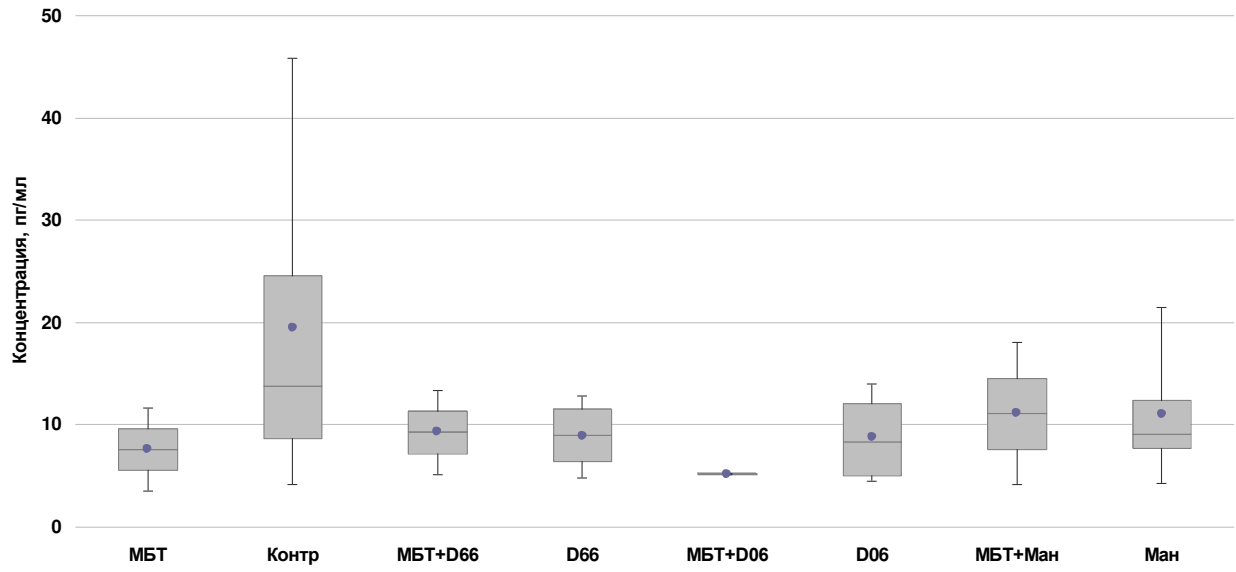
3.3. Влияние декстранов на цитокиновый ответ на микобактерии *in vitro*

Задача: исследовать влияние декстрана и олигодекстрана на цитокиновый ответ макрофагов человека при добавлении к ним микобактерий или их метаболита ManLAM

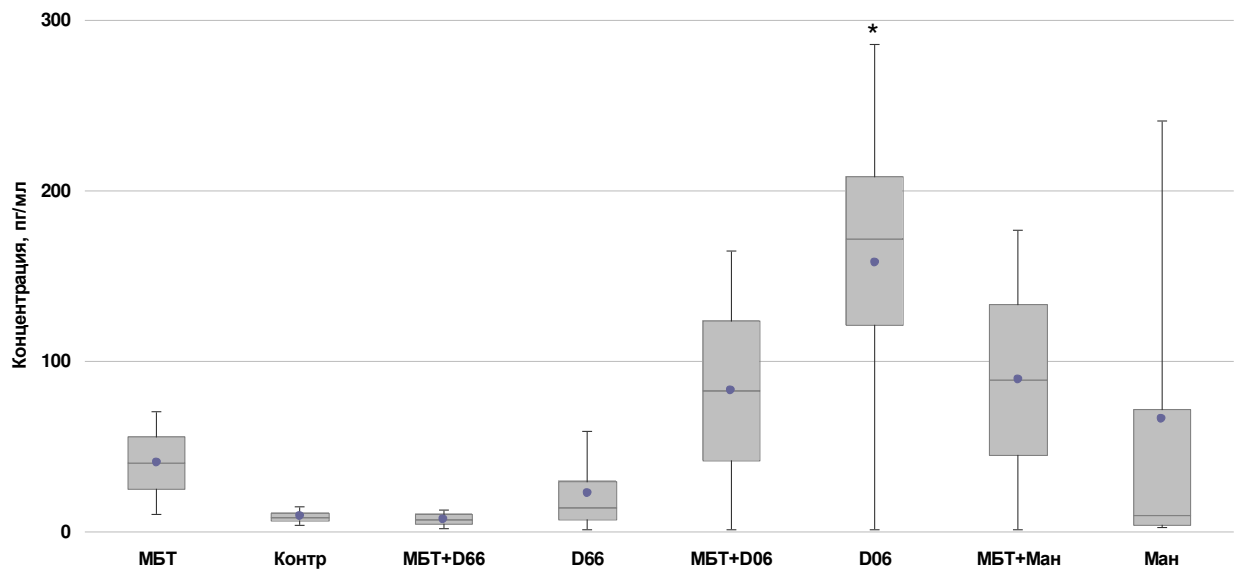
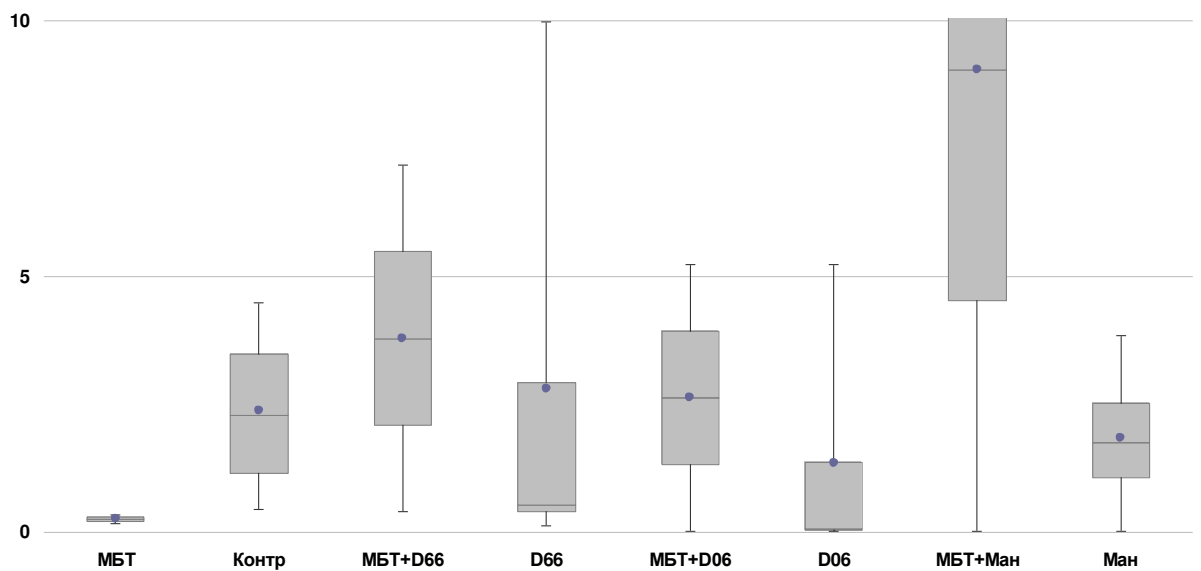
3.3.1. Влияние декстранов на цитокиновый ответ макрофагов на *M. tuberculosis*

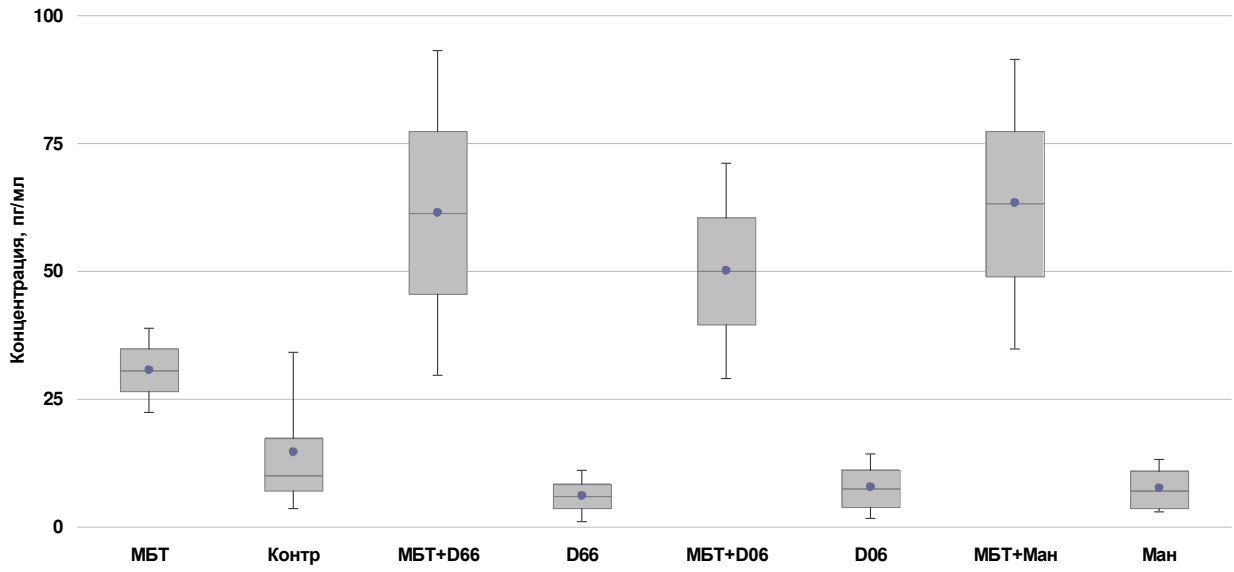
Инкубация макрофагов с декстраном и олигодекстраном практически не влияла на базальную продукцию ИФН- γ (Рисунок 14). Концентрация ИФН- γ в среде зараженных клеток на первые сутки после заражения оставалась без изменений вне зависимости от добавления исследуемых веществ. На 7 сутки инфицированные клетки продуцировали в среду в среднем несколько больше ИФН- γ , чем неинфицированные, что согласуется с данными других исследователей [247, 248], отличия не были статистически значимы. Добавление к зараженным клеткам исследуемых веществ: декстрана, олигодекстрана и маннозы — приводило к незначительному и статистически не значимому росту продукции ИФН- γ на 7 сутки.

Важно отметить, что при объединении данных, полученных для 1 и 7 суток инкубации, прединкубация с декстранами повышает соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 в 5,1 раз при применении одностороннего Т теста (основания применения: все значения с добавлением декстрана превышают значения в контроле), при уровне значимости $P=0,07$.

ИФН- γ , 1 сутки

ИЛ-10, 1 сутки

ИФН- γ / ИЛ-10, 1 сутки

ИФН- γ , 7 сутки

ИЛ-10, 7 сутки

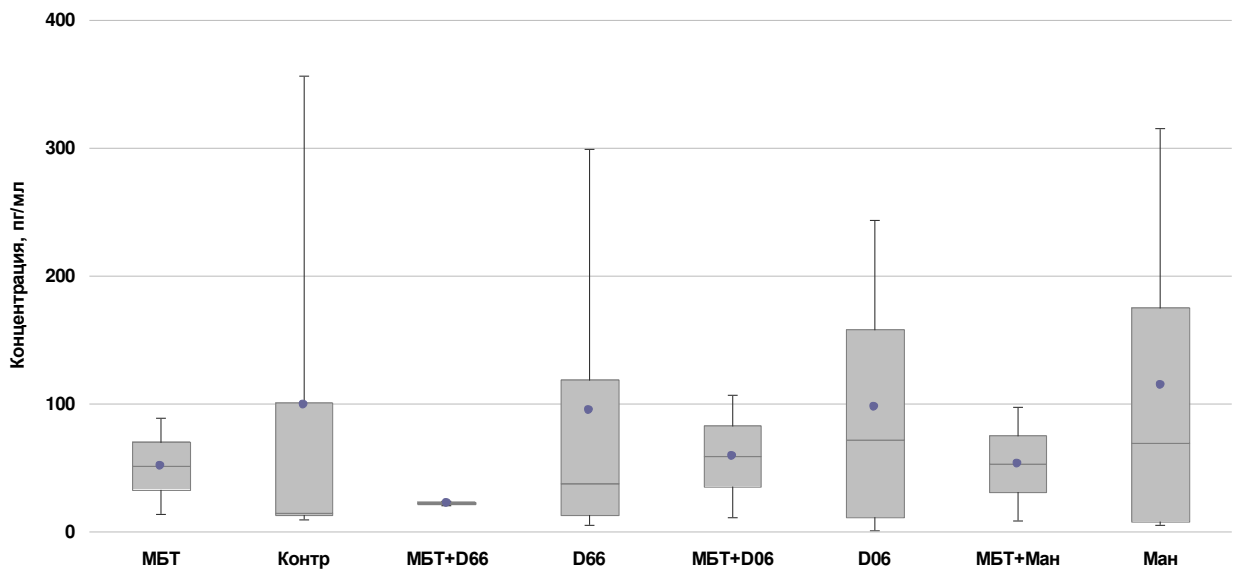
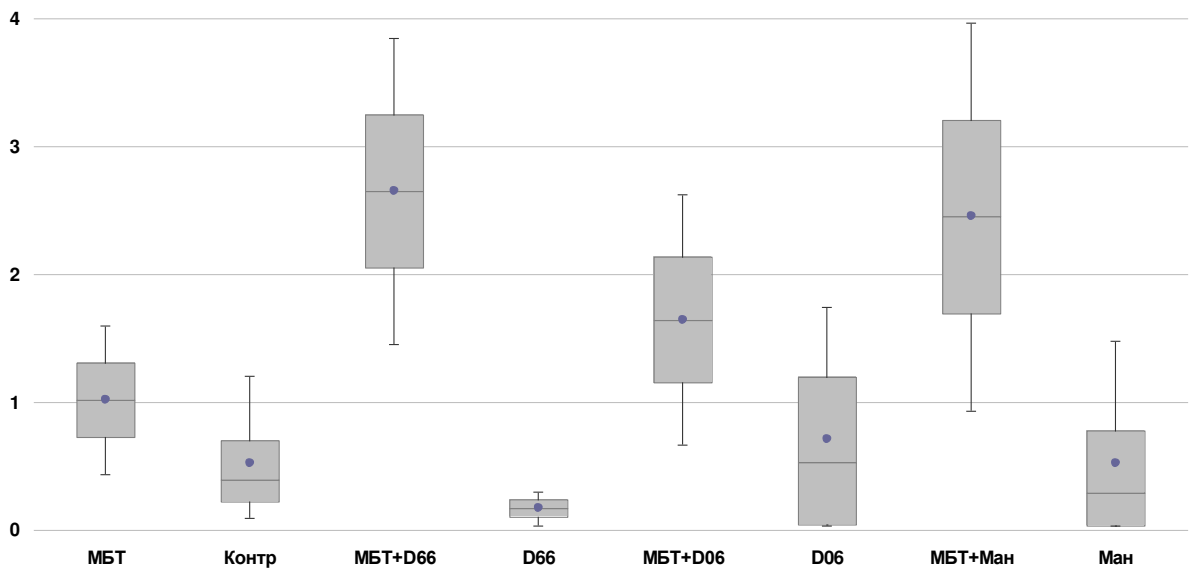
ИФН- γ / ИЛ-10, 7 сутки

Рисунок 14. Влияние декстрана (D66), олигодекстрана (D06) и маннозы (Ман) на концентрацию ИФН- γ , ИЛ-10 и на соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 в культуральной среде при добавлении МБТ H37Rv к макрофагам человека

Примечание. Клетки инкубировали с исследуемыми веществами в течение 30 минут до заражения, образцы взяты через 1 и 7 суток после инфицирования. На рисунке отмечены максимальные и минимальные значения, границы 1 и 3 квартилей, средние значения (точки) и медианы (линии). Значимость статистических различий проверена Т тестом Стьюдента. * — $P < 0.05$. Приведены данные от 2 до 4 экспериментальных серий

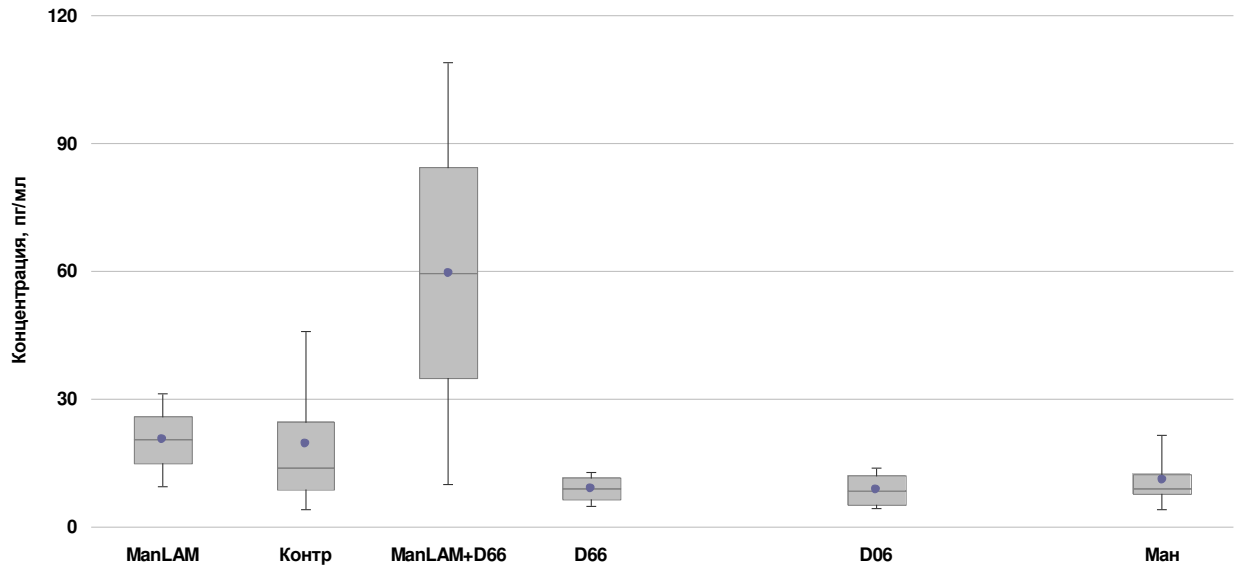
Добавление к культивируемым клеткам декстрана 66 влияло на продукцию ИЛ-10 макрофагами на 1 и 7 сутки инкубации незначительно (Рисунок 14). Олигодекстран статистически значимо повышал продукцию ИЛ-10 макрофагами на 1 сутки в среднем в 18 раз.

Подсчет соотношения концентраций ИФН- γ /ИЛ-10 показал, что оно менялось в зависимости от добавляемых к клеточным культурам соединений и от инфицированности культур, но все данные изменения не были статистически значимы (Рисунок 14). Заражение клеток на 1 сутки мало влияло на это соотношение, но можно отметить самые низкие показатели у зараженных клеток, не получавших никакие вещества. На 7 сутки параметр ИФН- γ /ИЛ-10 был в среднем в 2 раза больше у зараженных клеток, чем у неинфицированных. Добавление к культуре макрофагов декстрана на 7 сутки приводило росту соотношения ИФН- γ /ИЛ-10 в среднем в 2,5 раза.

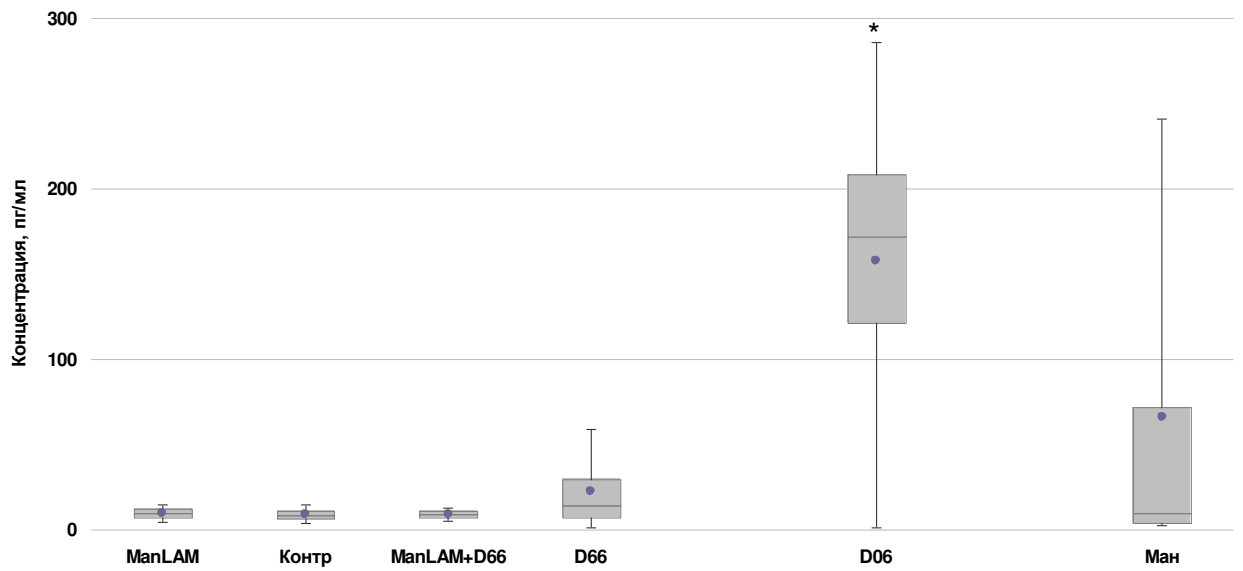
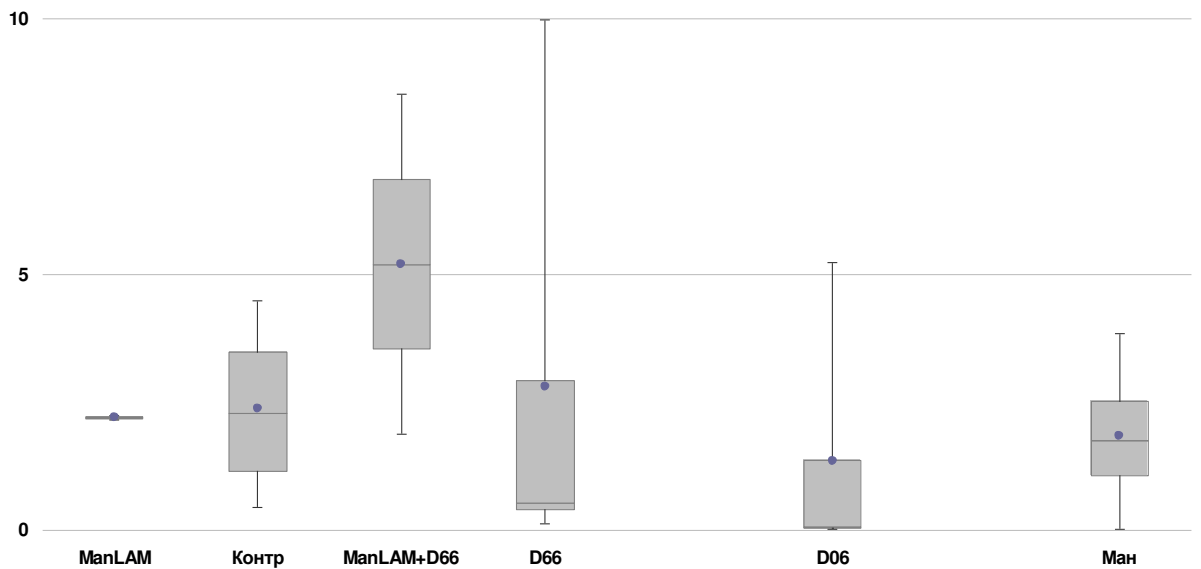
Различия эффектов декстрана (D66) и олигодекстрана (D06) можно объяснить тем, что крупная молекула декстрана способна взаимодействовать с несколькими рецепторами МР (что выражается в ее повышенной способности активировать эндоцитоз [8]), а генерация внутриклеточных сигналов зачастую связана именно с кластеризацией и одновременной активацией рецепторов [249].

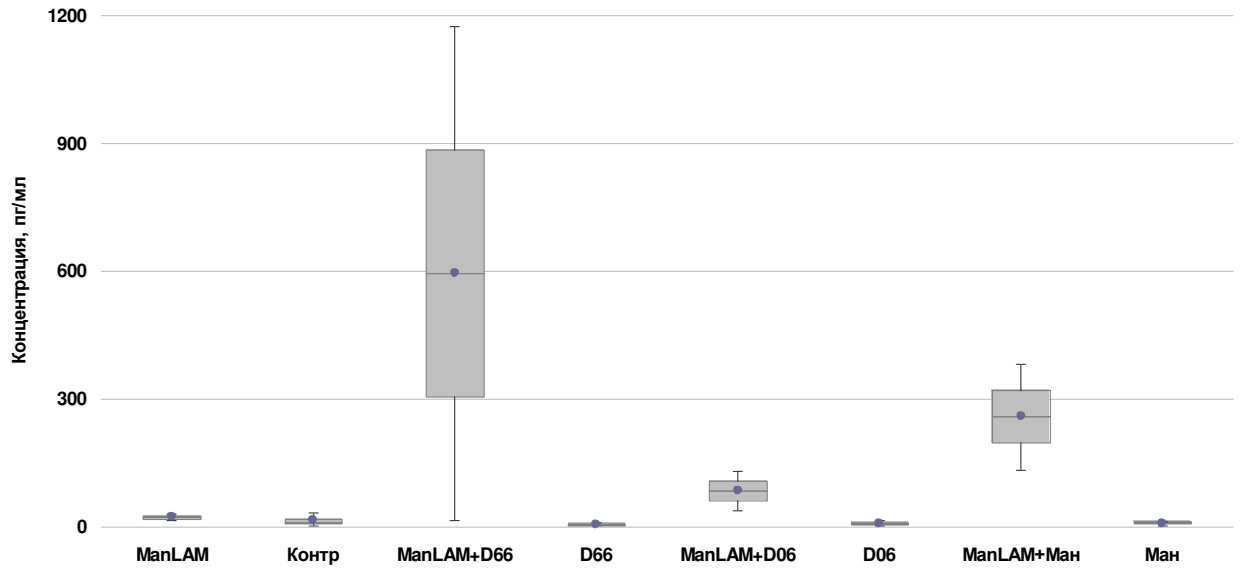
3.3.2. Влияние декстранов на цитокиновый ответ макрофагов на ManLAM

Микобактерии меняют профиль активации иммунокомпетентных клеток, непосредственно контактируя с клеточной мембраной или выделяя во внеклеточную среду свои компоненты. Одним из соединений микобактерий, воздействующих на клетки организма-хозяина, является компонент бактериальной стенки ManLAM. Этот маннозилированный липид, взаимодействуя с рецепторами МР [16] и DC-SIGN [14], влияет на миелоидные клетки, способствуя развитию противовоспалительного фенотипа и подавляя Th1 ответ. Мы исследовали, каким образом преинкубация клеток с декстранами влияет на цитокиновый ответ макрофагов после добавления ManLAM микобактерий H37Rv (Рисунок 15).

ИФН- γ , 1 сутки

ИЛ-10, 1 сутки

ИФН- γ / ИЛ-10, 1 сутки

ИФН- γ , 7 сутки

ИЛ-10, 7 сутки

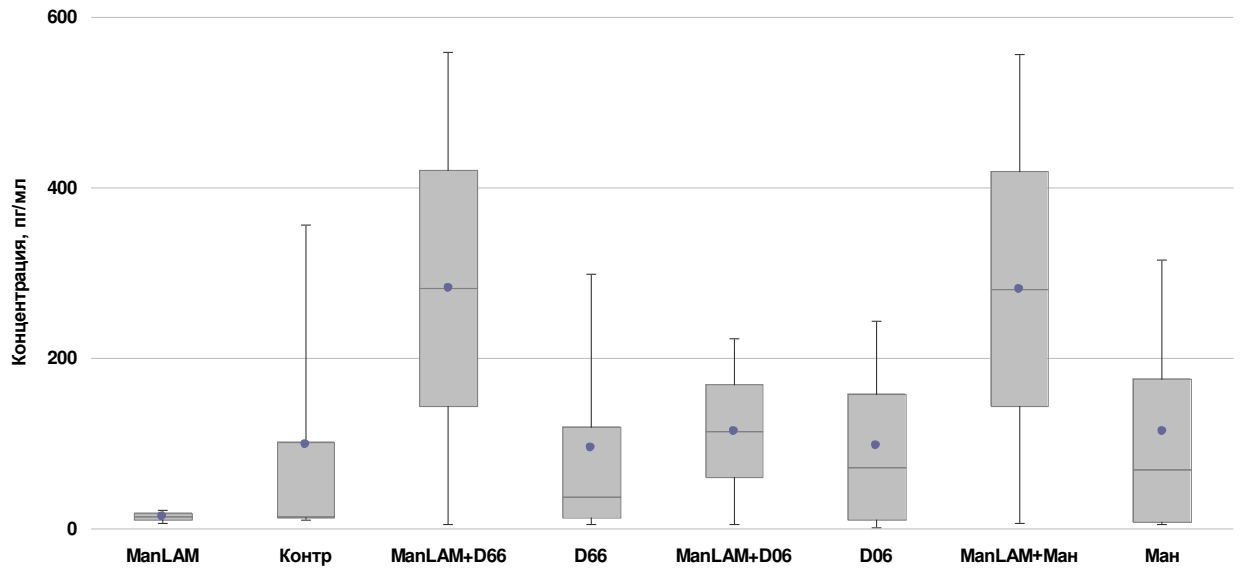
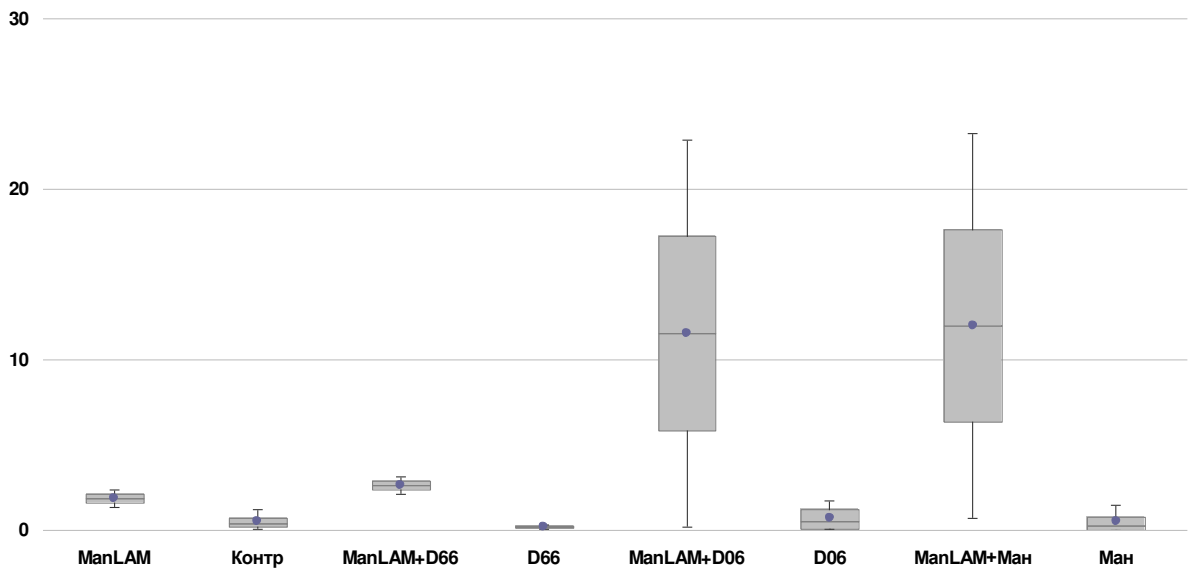
ИФН- γ / ИЛ-10, 7 сутки

Рисунок 15. Влияние декстрана (D66), олигодекстрана (D06) и маннозы (Ман) на концентрацию ИФН- γ , ИЛ-10 и на соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 в культуральной среде при добавлении ManLAM (маннозилированного метаболита МБТ H37Rv) к макрофагам человека

Примечание. Клетки инкубировали с исследуемыми веществами в течение 30 минут до добавления ManLAM, образцы взяты через 1 и 7 суток после добавления. На рисунке отмечены максимальные и минимальные значения, границы 1 и 3 квартилей, средние значения (точки) и медианы (линии). Значимость статистических различий проверена Т тестом Стьюдента. * — $P < 0.05$. Приведены данные от 2 до 4 экспериментальных серий

На первые сутки количество ИФН- γ и соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 в среде клеток, получавших декстран перед добавлением ManLAM, были в среднем выше в 2 раза, но различия не были статистически значимы (Рисунок 15). На седьмые сутки соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 в среде клеток, получавших олигодекстран и маннозу перед добавлением ManLAM, было в среднем выше более, чем в 4 раза, но различия также не были статистически значимы.

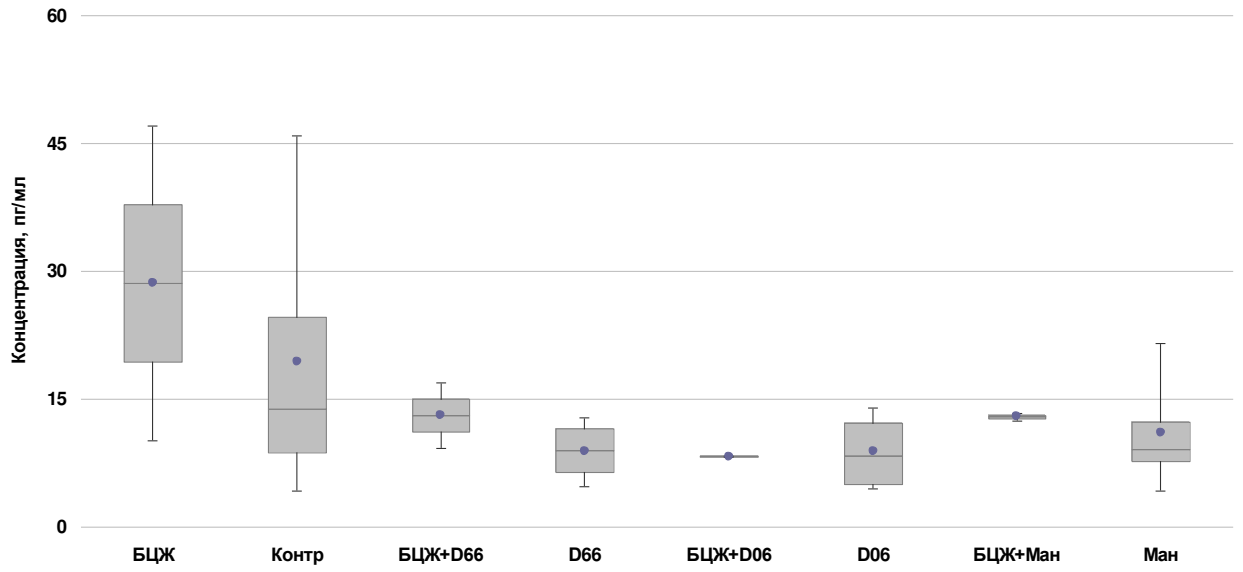
3.3.3. Влияние декстранов на цитокиновый ответ макрофагов на *M. bovis* BCG

Микобактерии БЦЖ, используемые в составе противотуберкулезных вакцин, *in vivo* отличаются эффективной индукцией ИФН- γ , но в культуре макрофагов продукцию этого цитокина они не активируют [250]. Было интересно проверить, как декстраны могут повлиять на изменение цитокинового ответа макрофагов на микобактерии БЦЖ (Рисунок 16).

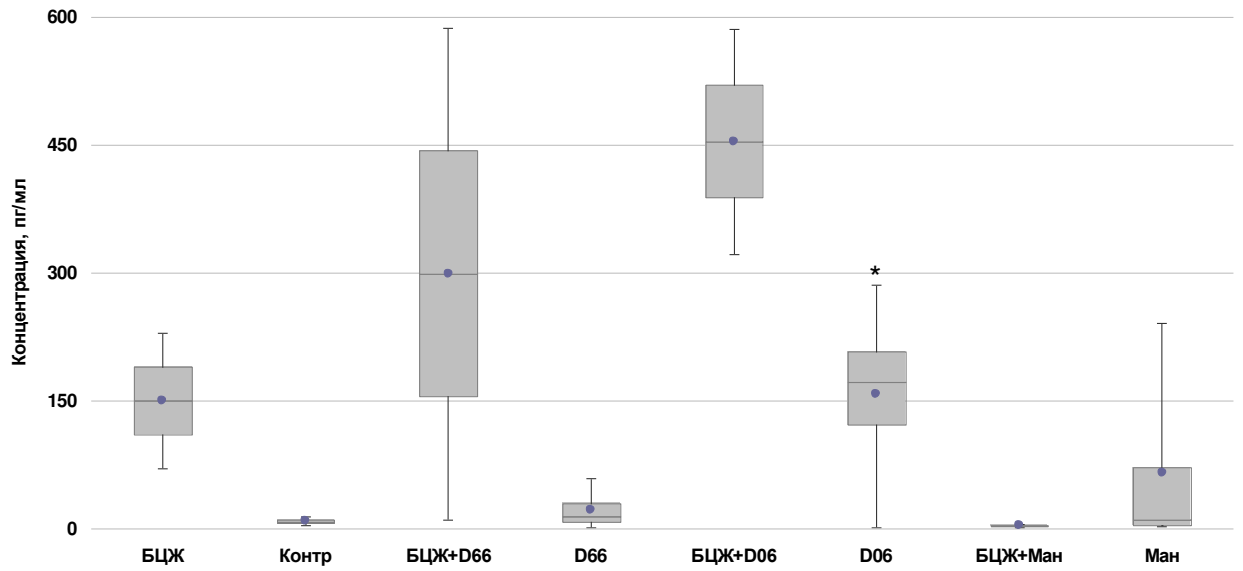
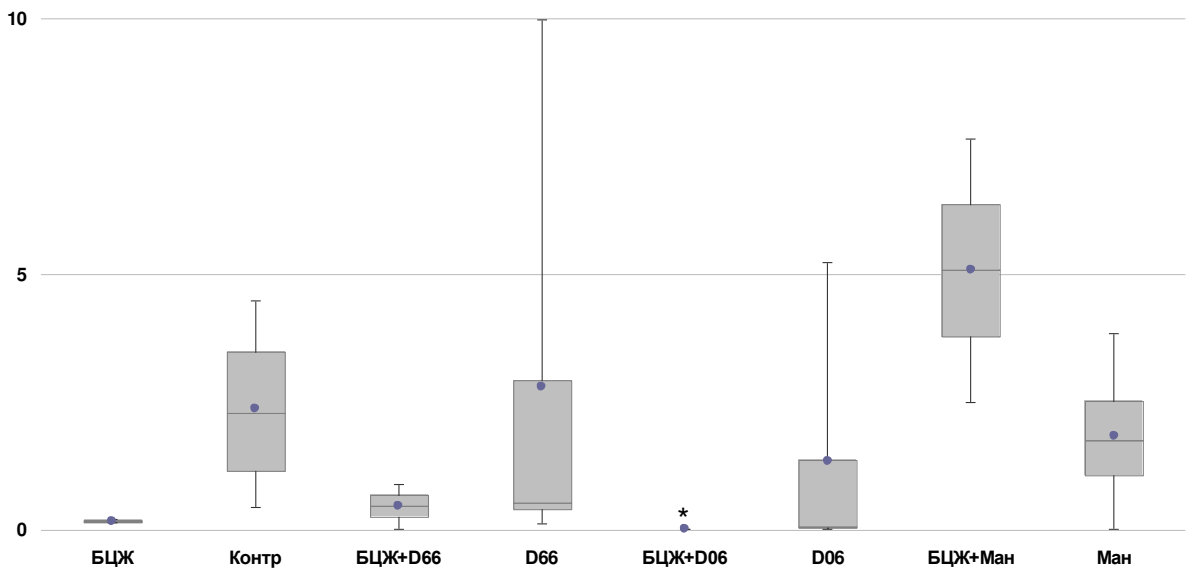
Прединкубация с декстранами приводила к выраженной тенденции к снижению продукции ИФН- γ , и повышению продукции ИЛ-10, как на 1, так и на 7 сутки. Несмотря на отсутствие статистически значимых отличий в содержании самих цитокинов в среде, олигодекстран статистически значимо снижал соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 на 1 сутки инкубации: более чем в 8 раз. Несмотря на это, на 7 сутки соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 показало тенденцию к росту в случае прединкубации как с декстраном, так и олигодекстраном; тенденцию к наибольшему росту вызвала прединкубация с маннозой (Рисунок 16).

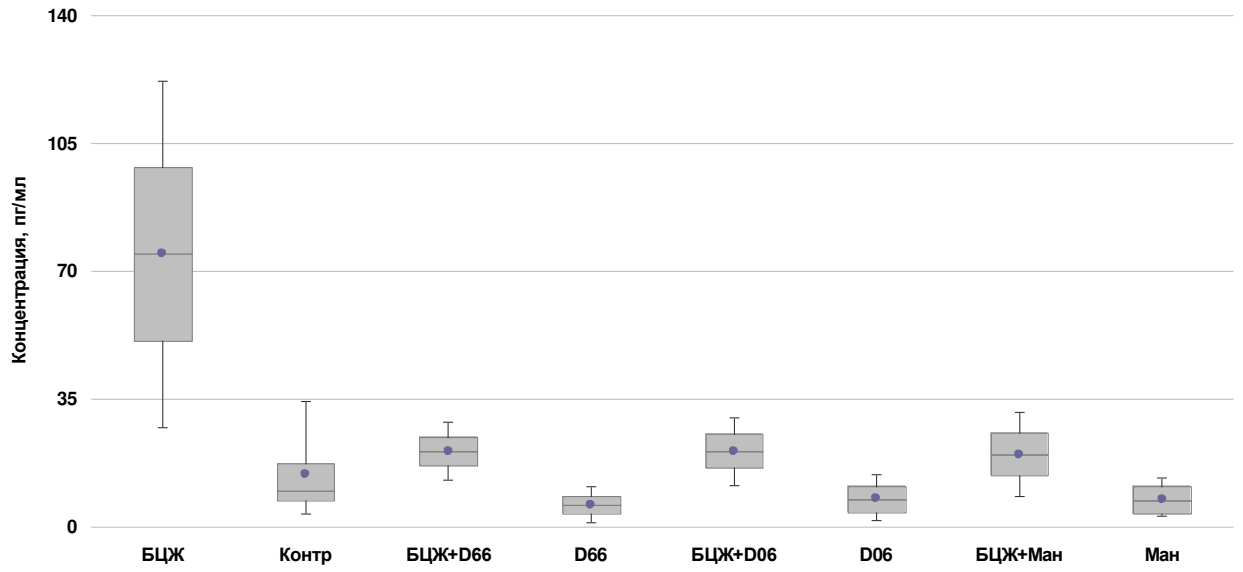
Рисунок 16 (на следующей странице). Влияние декстрана (D66), олигодекстрана (D06) и маннозы (Ман) на концентрацию ИФН- γ , ИЛ-10 и на соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 в культуральной среде при добавлении микобактерий БЦЖ к макрофагам человека

Примечание. Клетки инкубировали с исследуемыми веществами в течение 30 минут до добавления БЦЖ, образцы взяты через 1 и 7 суток после инфицирования. На рисунке отмечены максимальные и минимальные значения, границы 1 и 3 квартилей, средние значения (точки) и медианы (линии). Значимость статистических различий проверена Т тестом Стьюдента. * — $P < 0.05$. Приведены данные от 2 до 4 экспериментальных серий

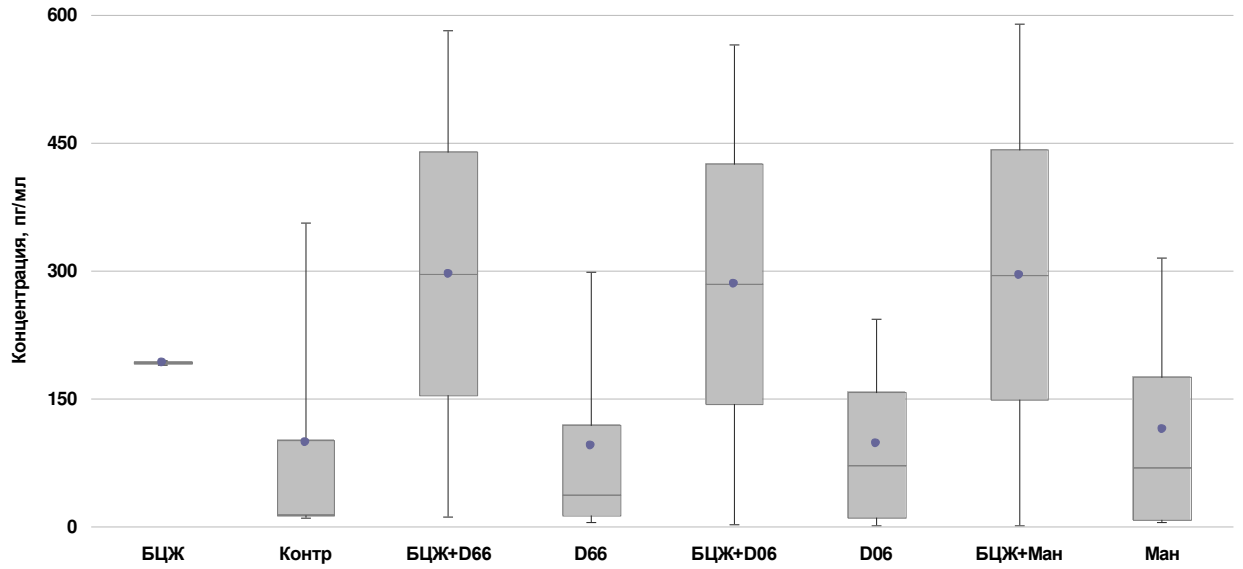
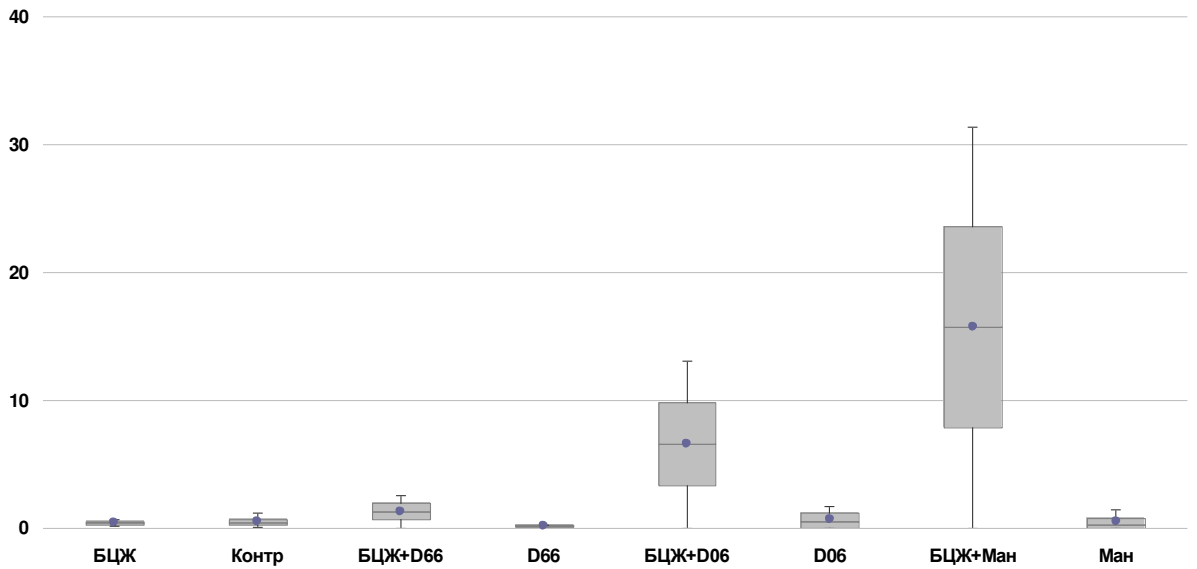
ИФН- γ , 1 сутки

ИЛ-10, 1 сутки

ИФН- γ / ИЛ-10, 1 сутки

ИФН- γ , 7 сутки

ИЛ-10, 7 сутки

ИФН- γ / ИЛ-10, 7 сутки

3.4. Влияние декстранов на экспрессию генов цитокинов макрофагами

Задача: исследовать влияние декстрана и олигодекстрана на экспрессию генов цитокинов в макрофагах человека, зараженных микобактериями туберкулеза H37Rv

Было исследовано влияние декстранов на экспрессию генов, кодирующих мРНК цитокинов ИФН- γ , ИЛ-10 и ТФР- β 1 (*IFNG*, *IL10*, и *TGFB1*). В результате можно заметить ряд тенденций, но статистически значимые отличия между контрольными и опытными образцами обнаружены не были. Можно отметить рост экспрессии гена *IFNG* в динамике (Рисунок 17).

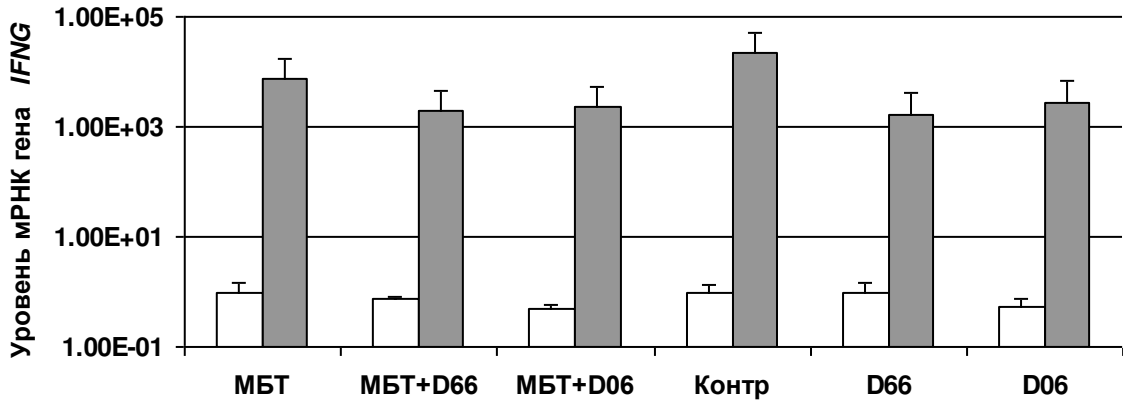


Рисунок 17. Влияние декстрана (D66) и олигодекстрана (D06) на относительное количество мРНК гена *IFNG* в макрофагах, зараженных микобактериями туберкулеза

Примечание. Светлые столбцы: 1 сутки инкубации (оценка сверху); темные столбцы: 7 суток инкубации. Данные нормированы по референсному гену β -актина, значение незараженного контроля (1 сутки) принято за единицу. Приведены усредненные данные двух независимых экспериментов, $n=2$

В зараженных клетках, получивших олигодекстран, статистически не значимо повышен уровень экспрессии гена *IL10* на 1 сутки (в среднем в 8 раз), при этом добавление декстрана, наоборот, привело к снижению экспрессии гена *IL10* (в среднем в 20 раз) (Рисунок 18). Полученные данные хорошо согласуются с данными ИФА (Рисунок 14).

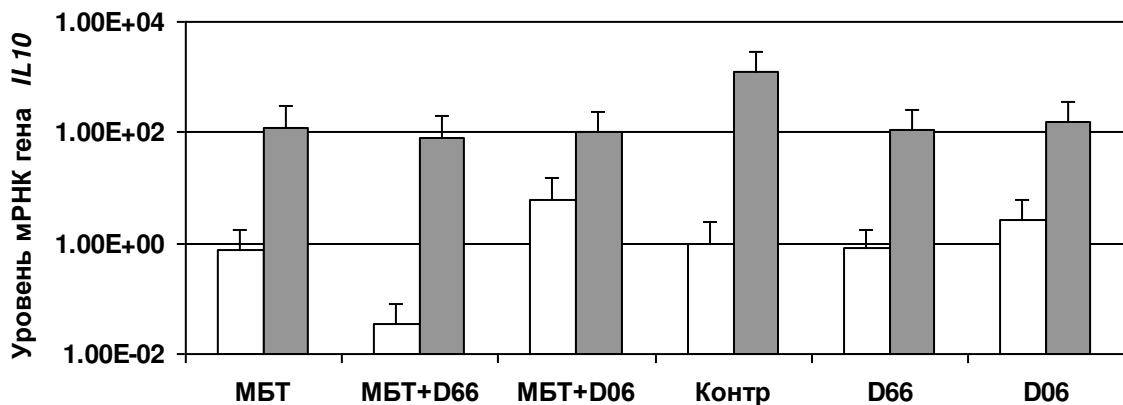


Рисунок 18. Влияние декстрана (D66) и олигодекстрана (D06) на относительное количество мРНК гена *IL10* в макрофагах, зараженных микобактериями туберкулеза

Примечание. Светлые столбцы: 1 сутки инкубации; темные столбцы: 7 суток инкубации. Данные нормированы по референсному гену β -актина, значение незараженного контроля (1 сутки) принято за единицу. Приведены усредненные данные двух независимых экспериментов, $n=2$

Было проверено влияние декстранов на экспрессию гена *TGF β 1*, так как это один из важнейших факторов, определяющих перестройку внеклеточного матрикса. На 7 сутки добавление декстрана и олигодекстрана к зараженным клеткам вызывали заметное, хотя и статистически не значимое, снижение уровня мРНК ТФР- β 1 в 1051 и 57 раз, соответственно. В незараженных клетках олигодекстран снижал экспрессию гена *TGF β 1* примерно в 270 раз ниже базального уровня (Рисунок 19).

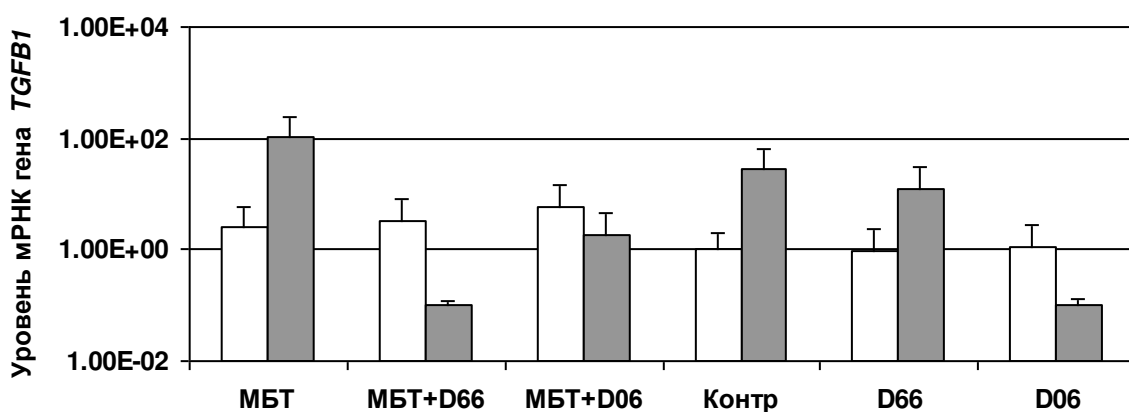


Рисунок 19. Влияние декстрана (D66) и олигодекстрана (D06) на относительное количество мРНК гена *TGF β 1* в макрофагах, зараженных микобактериями туберкулеза

Примечание. Светлые столбцы: 1 сутки инкубации; темные столбцы: 7 суток инкубации. Данные нормированы по референсному гену β -актина, значение незараженного контроля (1 сутки) принято за единицу. Приведены усредненные данные двух независимых экспериментов, $n=2$

3.5. Влияние декстрана на цитокиновый ответ на микобактерии *in vivo*

Задача: исследовать влияние декстрана на цитокиновый ответ на микобактерии туберкулеза в легком мыши

Для решения данной задачи мышам линии BALB/c вводили интраназально суспензию, которая содержала или не содержала микобактерии и декстран. Спустя 2 суток выделяли легкие животных (срок выбран на основании работ [239] и [240]), получали гомогенат и оценивали в нем концентрации цитокинов ИФН- γ и ИЛ-10. В эксперименте использовали только клинический декстран, D60.

Введение как декстрана, так и микобактерий, вызывало тенденцию к росту концентрации ИФН- γ в легких животных более чем в 2 раза. При этом одновременное введение декстрана вместе с микобактериями привело к статистически значимому снижению более чем в 5 раз концентрации ИФН- γ в легких (по сравнению с введением только микобактерий) (Рисунок 20). Tween 80, использованный для предотвращения слипания микобактерий (стандартный метод), не менял концентрацию ИФН- γ относительно контроля.

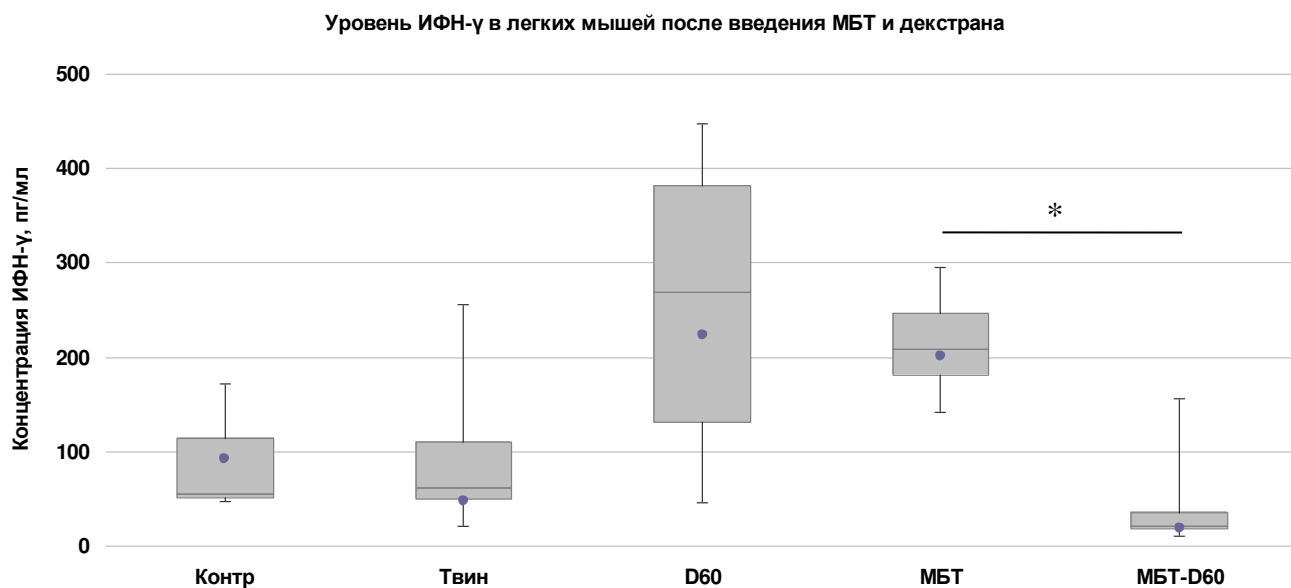


Рисунок 20. Влияние введения декстрана (D60) и убитых теплом микобактерий H37Rv (МБТ) на концентрацию ИФН- γ в ткани легких

Примечание. По оси ординат абсолютная концентрация цитокина ИФН- γ в пг/мл. На диаграмме представлены максимальные и минимальные значения, границы 1 и 3 квартилей, средние значения (точки) и медианы (линии). Значимость статистических различий рассчитана по U критерию Манна-Уитни. * — $\alpha=0,05$. Контрольные группы включали 3-4 мыши, экспериментальные до 9 мышей ($n=3-9$)

Концентрация ИЛ-10 в ткани легкого имела тенденцию к росту при введении микобактерий или декстрана. Введение декстрана одновременно с микобактериями приводит к статистически значимому снижению уровня ИЛ-10 в 7,5 раз по сравнению с уровнем у животных, которым вводили микобактерии (Рисунок 21).

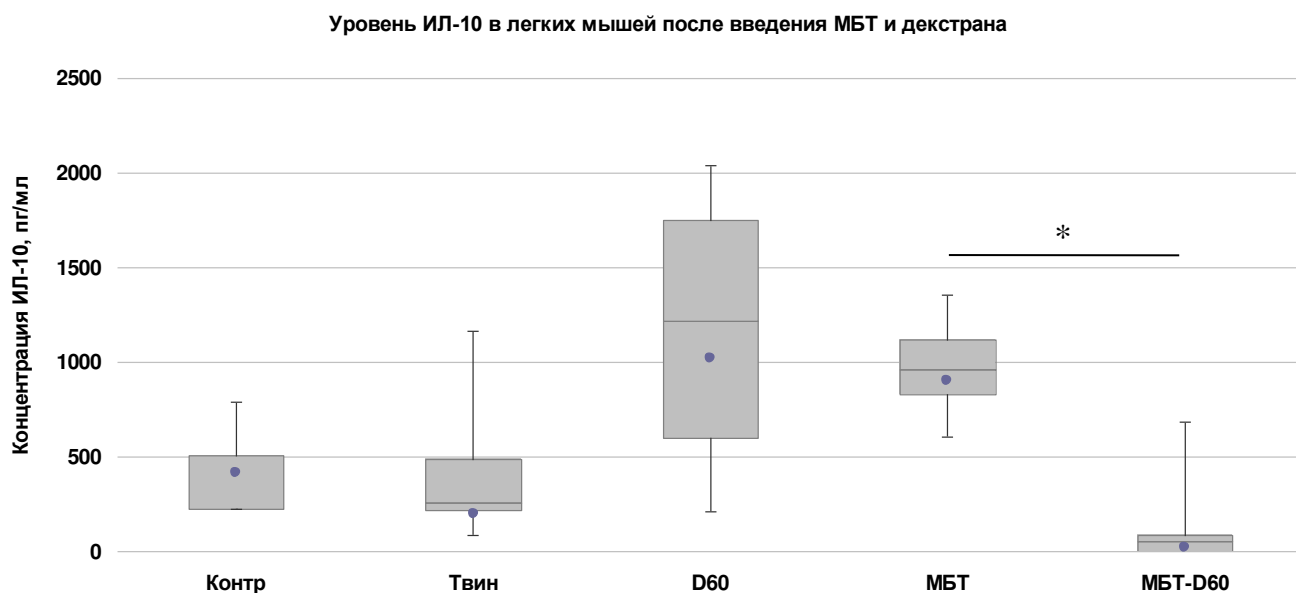


Рисунок 21. Влияние введения декстрана (D60) и убитых теплом микобактерий H37Rv (МБТ) на концентрацию ИЛ-10 в ткани легких

Примечание. По оси ординат абсолютная концентрация цитокина ИЛ-10 в пг/мл. На диаграмме представлены максимальные и минимальные значения, границы 1 и 3 квартилей, средние значения (точки) и медианы (линии). Значимость статистических различий рассчитана по U критерию Манна-Уитни. * — $\alpha=0,05$. Контрольные группы включали 3-4 мыши, экспериментальные до 9 мышей (n=3-9)

Введение в легкие микобактерий и/или декстрана не влияло на концентрации цитокинов в плазме крови, концентрации ниже предела детекции (графики не приведены). Ни введение декстрана, ни введение микобактерий не влияют на соотношение концентраций ИФН- γ и ИЛ-10 в ткани легкого так сильно, как их одновременное введение. Декстран увеличивает среднее соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 в легких животных, которым вводили микобактерии, более чем в 10 раз (различия статистически значимы) (Рисунок 22). Данный феномен можно предположительно объяснить тем, что как декстран, так и микобактерии, вызывают "сбалансированную" активацию макрофагов, одновременно повышая в них уровни ИФН- γ и ИЛ-10. Но в случае одновременного введения микобактерий и декстрана, декстран меняет совокупность сигналов, которые через рецепторы подает микобактерия, в частности, ингибирует сигналы, подаваемые через маннозный рецептор, и блокирующие Th1 ответ. Кроме этого, возможно независимое адьювантное действие декстрана. Данные гипотезы требуют подробного обсуждения (п. 4.4.5) и экспериментальной проверки.

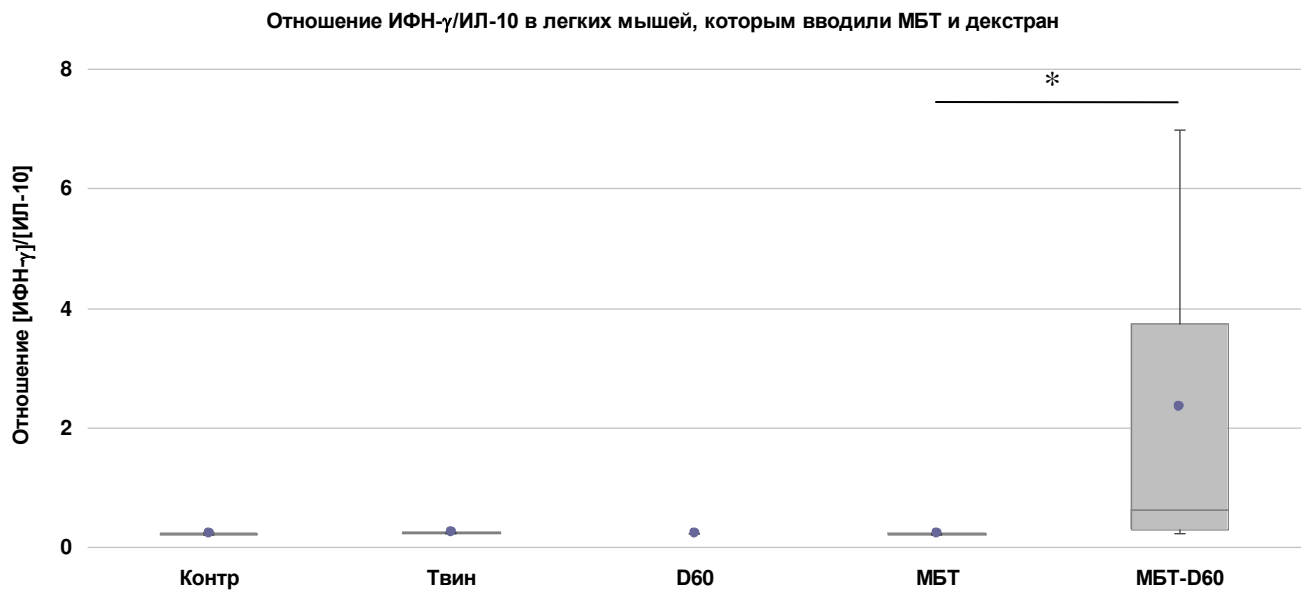


Рисунок 22. Влияние введения декстрана (D60) и убитых теплом микобактерий H37Rv (МБТ) на соотношение концентраций ИФН- γ /ИЛ-10 в легких

Примечание. По оси ординат соотношение концентраций ИФН- γ /ИЛ-10. На диаграмме представлены максимальные и минимальные значения, границы 1 и 3 квартилей, средние значения (точки) и медианы (линии). Значимость статистических различий рассчитана по U критерию Манна-Уитни. * — $\alpha=0,05$. Контрольные группы включали 3-4 мыши, экспериментальные до 9 мышей ($n=3-9$)

Резюме. В работе были исследованы эффекты декстрана и олигодекстрана в моделях ВИЧ и туберкулезной инфекции *in vitro* и *in vivo*. В бесклеточной модели было показано, что декстран и олигодекстран ингибируют взаимодействие рецептора DC-SIGN с маннозилированным белком (общая модель патогена). В культуре клеток В-ТНР-1/DC-SIGN было показано, что декстран и олигодекстран способны снизить доступность рецептора DC-SIGN для ВИЧ-1. В культуре макрофагов добавление декстрана перед введением микобактерий H37Rv, их компонента ManLAM или микобактерий БЦЖ сложным образом влияло на концентрации цитокинов ИФН- γ и ИЛ-10. Введение декстрана в легкие мышам одновременно с микобактериями H37Rv, значительно (в среднем в 10 раз) повышало соотношение концентрации цитокинов ИФН- γ /ИЛ-10 в ткани легкого.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

ВИЧ инфекция и туберкулез — две самые смертоносные инфекции на планете. Сочетание этих болезней особо опасно для их носителя [3]. Рецепторы MR и DC-SIGN, как показано во множестве работ, способны опосредовать инфицирование и транс-инфицирование ВИЧ [104, 122], а их связывание с микобактериями модулирует иммунный ответ, подавляя Th1 реакции [6, 16]. Заражение макрофагов и дендритных клеток и образование внутри них вирусных резервуаров — это один из ключевых элементов патогенеза и одна из важнейших проблем в излечении ВИЧ инфекции [251]. При этом подавление эффективного Th1 ответа, хронизация и латентность инфекционного процесса — одна из самых значимых проблем при лечении туберкулеза [252]. Новые подходы к терапии ВИЧ инфекции и туберкулеза могут основываться как на ингибировании заражения клеток [253], так и на модуляции реакции организма-хозяина на патогены [186, 224, 225]. Нашей задачей было проверить, могут ли декстраны блокировать взаимодействие патогенов с MR и DC-SIGN и таким образом — хотя бы частично — препятствовать захвату патогенов и модулировать иммунный ответ.

Рецепторы MR и DC-SIGN относятся к лектинам С-типа, рецепторам к углеводам. Как правило, это трансмембранные белки, содержащие домен распознавания углеводов, способные активировать внутриклеточные сигнальные пути и/или эндоцитоз [5]. К распознаваемым углеводным группам обычно относятся терминальные остатки маннозы, фукозы, N-ацетилглюкозамина, и глюкозы или фукозы, галактозы и N-ацетилгалактозамина [254]. Лектины С-типа играют важную роль в распознавании углеводных мотивов как собственного организма, так и патогенов, подавая внутрь клетки сигналы типа "свой-чужой" [255].

Исследование роли рецепторов к углеводам в патогенезе инфекционных заболеваний — важный раздел иммунологии и микробиологии. Разные лиганды, взаимодействуя с одним рецептором, запускают различные сигнальные пути и могут смещать реакцию клеток в противоположных направлениях [16], в том числе за счет активации дополнительных рецепторов [256]. В данной работе мы рассмотрели, как декстран и олигодекстран, будучи лигандами рецепторов MR и DC-SIGN, важных при инфекционных заболеваниях, способны влиять на процесс инфицирования иммунных клеток ВИЧ и микобактериями туберкулеза.

В бесклеточной модели мы проверили, могут ли декстраны ингибировать взаимодействие маннозилированного белка с рецептором DC-SIGN. В культуральных моделях ВИЧ-инфекции мы оценивали способность декстрана и олигодекстрана оказывать влияние на

DC-SIGN-зависимое инфицирование клеток человека. В моделях туберкулеза *in vitro* и *in vivo* мы проверили, могут ли декстраны влиять на цитокиновый ответ в культуре и в ткани.

4.1. Ингибирование DC-SIGN и DC-SIGN-зависимого эндоцитоза декстранами

Ингибирование DC-SIGN декстранами в бесклеточной модели

В культуральных исследованиях ранее было показано, что блокады рецепторов MR и DC-SIGN на поверхности незрелых дендритных клеток, полученных из моноцитов крови человека, достаточно, чтобы полностью ингибировать захват декстрана [7]. Сила связывания между декстраном и рецепторами не была известна, поэтому не было ясно, в какой мере декстран способен ингибировать связывание углеводных структур с MR или DC-SIGN. Для того, чтобы оценить аффинность декстрана к DC-SIGN и понять, может ли декстран (и если да, то при каких концентрациях) ингибировать взаимодействие этого рецептора с маннозилированными структурами патогенов, были проведены исследования в бесклеточной модели методом поверхностного плазмонного резонанса. Этот метод применяется для скрининга потенциальных ингибиторов лектинов [257] и демонстрирует хорошую сопоставимость с результатами культуральных исследований [258].

Нами впервые показано, что декстран и олигодекстран могут ингибировать взаимодействие рецептора DC-SIGN с маннозилированными биологическими молекулами (модельная молекула — маннозилированный БСА), на основании чего можно оценить силу молекулярного взаимодействия декстрана и олигодекстрана с рецептором. Концентрации, при которых олигодекстран ингибирует взаимодействие между маннозилированным БСА и DC-SIGN ($IC_{50} = 4.1$ мМ) сопоставима с ингибирующими концентрациями D-маннозы ($IC_{50} = 3.1$ мМ) и фукозы ($IC_{50} = 2.5$ мМ). Для декстрана, в силу полимерной природы и большего числа сайтов связывания, ингибирующие концентрации намного ниже ($IC_{50} = 35,4$ мкМ).

Наши наблюдения свидетельствуют о том, что линейно расположенные α -1,6-связанные остатки глюкозы в высокомолекулярном декстране D66 и олигодекстране D06 в равной степени доступны для связывания с рецептором DC-SIGN, так как массовое количество обоих соединений, необходимое для 50% ингибирования связывания примерно одинаково. Действительно, если бы только концевые остатки взаимодействовали с рецептором, значение IC_{50} м/о для декстрана D66 было бы значительно выше, чем для олигодекстрана D06.

По данным других авторов [39] можно предсказать связывание декстранов с MR и возможность ингибировать данный рецептор. Параметры такого ингибирования ранее не анализировались, и это может служить направлением для нового исследования.

Так как было показано, что декстраны способны ингибировать связывание DC-SIGN с остатками маннозы, данный результат позволил предположить, что декстраны смогут ингибировать DC-SIGN-опосредованное заражение в инфекционных моделях. Поэтому следующей задачей было проверить, могут ли декстраны ингибировать эндоцитоз ВИЧ, опосредованный рецептором DC-SIGN, в культуральной модели.

Влияние декстранов на DC-SIGN-зависимый эндоцитоз ВИЧ

В патогенезе ВИЧ инфекции основные клеточные мишени — CD4⁺ Т лимфоциты и макрофаги [259]. Заражение Т клеток наиболее эффективно, когда оно происходит через так называемый инфекционный синапс; подобный тип инфицирования называется транс-инфекцией [260]. Рецепторы, опосредующие транс-инфицирование, включают в первую очередь Siglec-1, а кроме него DC-SIGN, МР, лангерин, иммунный рецептор дендритных клеток (DCIR), гепарансульфат протеогликан, синдеканы и галактозилцерамид [261]. В исследованиях *in vitro* показано, что ингибирование рецептора DC-SIGN может снизить заражение дендритных клеток и существенно снизить транс-инфицирование Т клеток [122].

DC-SIGN это не основной рецептор, ответственный за транс-инфекцию ВИЧ [261, 262] и реальная роль DC-SIGN *in vivo* при ВИЧ остается неясной. Однако, сниженная экспрессия DC-SIGN при ВИЧ может быть ассоциирована со сниженной передачей инфекции от матери к ребенку [263] и некоторые генетические варианты DC-SIGN, вероятно, связанные со сниженной функциональностью, встречаются реже у ВИЧ-позитивных людей [118]. Известно, что существует транс-инфекция от макрофагов к Т клеткам [264] и DC-SIGN может опосредовать транс-инфекцию ВИЧ DC-SIGN-экспрессирующими макрофагами [265], которые встречаются *in vivo* в различных тканях и органах [263, 266].

Выбранная нами модель исследования — В клетки, экспрессирующие рецептор DC-SIGN. Действительно, активированные В лимфоциты способны экспрессировать DC-SIGN и такие клетки являются возможными передатчиками ВИЧ [61], однако важность такого пути транс-инфицирования *in vivo* не изучена.

Негативное влияние исследуемых соединений на клеточные функции маловероятно. Декстран применяли в клинике интраперитонеально в концентрациях до 32% [267], это соединение не вызывает цитотоксических эффектов в человеческих фибробластах в концентрациях по меньшей мере до 4% [268], не влияет на продукцию ИФН-γ and ИЛ-10 макрофагами в концентрации 0,5% (см. п. 3.3.1). Олигодекстран нетоксичен, если принимается перорально в виде 3% раствора [269]. Поэтому высокие значения EC₅₀ для декстрана и олигодекстрана компенсируются их низкой токсичностью.

Линия клеток В-ТНР-1/DC-SIGN практически идентична линии Raji/DC-SIGN [234] и репликация ВИЧ в этих клетках не происходит [241]. Кроме этого показано, что гликопротеин ВИЧ gp120 захватывается внутрь клеток Raji/DC-SIGN в то время, как его небольшая доля остается связанной на поверхности клеток; доля поверхностного связывания гликопротеина ВИЧ gp120 в 28% [270] хорошо соотносится с нашими данными: обычно, 30-40% (Рисунок 11).

В отсутствие репликации рост количества вирусной РНК, приходящейся на одну клетку, в 5 раз в периоде от 2 до 24 часов инкубации (Рисунок 10) требует объяснения. Действительно, за 2 часа эндоцитоз вируса выходит на плато насыщения, но репликация не начинается [271], а 24 часа достаточно для репликации [272]. Мы предполагаем, что под влиянием ВИЧ произошло увеличение экспрессии DC-SIGN клетками [273], что привело к захвату большего числа вирусных частиц внутри и на поверхности клеток. Это предположение требует проверки. Также возможно, что в данном типе клеток захват вируса происходит за более долгое время.

Декстран, вводимый нами в культуру за 30 минут до заражения, снижал степень заражения клеток В-ТНР-1/DC-SIGN вирусом ВИЧ, определяемую через 24 часа (Рисунок 10), что можно объяснить конкурентным ингибированием рецептора DC-SIGN на поверхности клеток, а также захватом декстрана внутрь клеток, вероятно, приводящим к снижению их способности к последующему эндоцитозу вирусных частиц. Однако, декстран также снижал степень заражения даже если вводился в культуру через 20 часов после заражения (за 4 часа до сбора образцов) (Рисунки 10, 11).

Эффект пост-инфекционного влияния декстрана и олигодекстрана на содержание ВИЧ внутри и на поверхности клеток можно объяснить балансом между процессами эндоцитоза и экзоцитоза. Действительно, В клетки способны не только к эндоцитозу [270], но и к экзоцитозу [274], который может активироваться в присутствии ВИЧ [275]. Выход ВИЧ из клеток посредством экзоцитоза возможен [276]. Помимо эндоцитоза, В клетки, захватившие ВИЧ в эндосомы посредством DC-SIGN, могут разрушать вирусные частицы [277], поэтому повышение количества вируса, ассоциированного с клетками, может быть связано с тем, что в первые 2 часа инкубации клетки более активно разрушали вирусные частицы (так, образование поздних эндосом, в которых может начинаться разрушение ВИЧ [278], может занимать около 30 минут [279]). При этом сам рецептор DC-SIGN способен отсоединяться от вируса еще в ранних эндосомах и может возвращаться в состав клеточной мембраны [280].

Примечательно, что декстран снижал количество вируса как внутри клеток (Рисунок 11), так и на их поверхности (если сравнить Рисунки 10 и 11). Исходя из полученных данных, можно предполагать, какая доля рецептора интернализирована, а какая находится на поверхности клеток.

Было интересно исследовать действие олигодекстранов, так как высокомолекулярные декстраны, являясь известными лигандами DC-SIGN [7], активируют эндоцитоз и попадают внутрь клеток, а это свойство может быть недостатком потенциального ингибитора входа вируса в клетку. Низкомолекулярные декстраны не являются активными индукторами эндоцитоза [8], но при этом даже олигодекстраны содержат достаточное количество глюкозных остатков (>3), чтобы связаться с активным центром DC-SIGN [281].

Олигодекстраны и декстраны дозозависимо снижали степень эндоцитоза вируса (Рисунок 13). При превышении определенной концентрации ингибирующая активность декстрана и олигодекстрана в использованной модели исследования достигала порогового значения. Вероятно, данный результат обусловлен эффектом насыщения сайтов связывания рецепторов в связи с избытком вводимого лиганда.

Важной находкой следует признать то, что декстран снижал степень зараженности клеток даже если был применен после инфицирования (для олигодекстрана данные отрицательные). Это свидетельствует о том, что природа связывания ВИЧ и DC-SIGN — обратимая, то есть при появлении других лигандов DC-SIGN, вирусные частицы могут "вытесняться" из взаимодействия с рецептором. За счет механизма обмена мембран эндосомального компартмента с плазмолеммой, характерного для многих типов клеток, клетки могут освобождаться от вирусной нагрузки (схема на Рисунок 23).

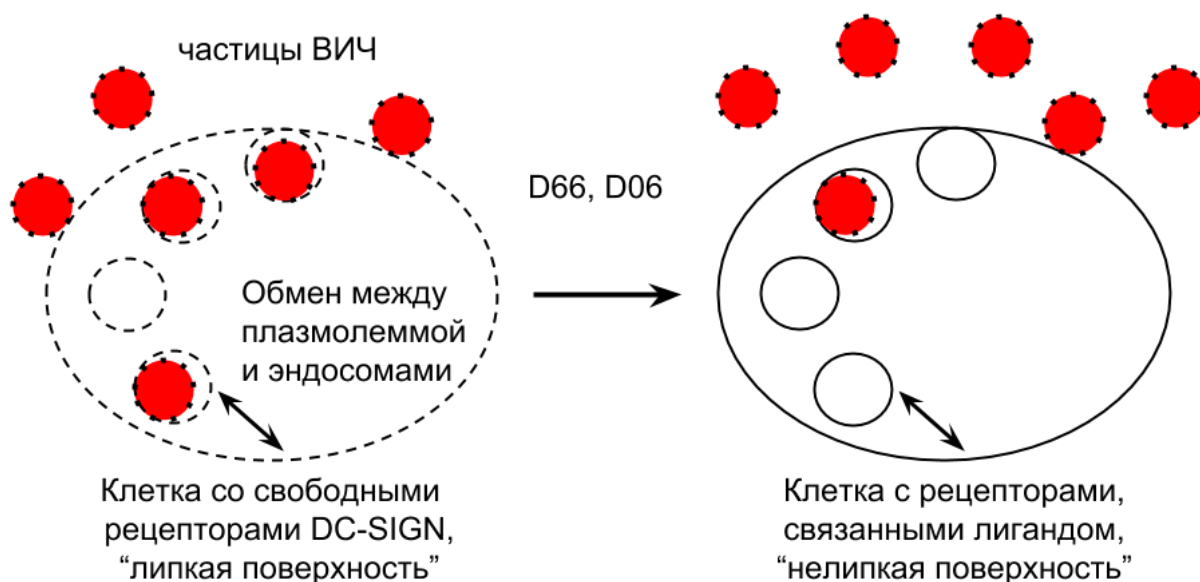


Рисунок 23. Обратимая природа связывания ВИЧ и DC-SIGN: схема

Примечание. Мембрана эндосом состоит из захваченных внутрь клетки участков плазмолеммы, но затем эндоцитированный материал может вновь выводиться на поверхность или в среду посредством экзоцитоза. Между свободными рецепторами DC-SIGN на клеточной поверхности/эндосомальных мембранах и рецепторами DC-SIGN, связавшимися с ВИЧ, устанавливается равновесие. При добавлении

декстрана (D66) или олигодекстрана (D06) баланс меняется: большинство рецепторов DC-SIGN теперь связывают декстран и олигодекстран и не могут связывать вирусные частицы.

В результате проведенных исследований по оценке влияния декстрана и олигодекстрана на эндоцитоз вирусных частиц нам удалось впервые обосновать потенциальную возможность применения декстранов разной молекулярной массы для блокады взаимодействия патогенов с рецептором DC-SIGN и торможения инфицирования клеток. DC-SIGN — это важный рецептор иммунных клеток, позволяющий патогенам проникнуть в клетки и модулировать иммунный ответ, зачастую в пользу патогена [122]. На стадии исследований находятся разные потенциальные ингибиторы DC-SIGN [170, 258, 282], разработаны подходы к скринингу таких соединений [169]. Сходные с декстраном, но зачастую разветвленные ингибиторы DC-SIGN углеводной природы и гликомиметики эффективно блокировали DC-SIGN-опосредованную цис- и транс-инфекцию ВИЧ [258, 283-285].

Учитывая наши результаты по DC-SIGN-опосредованному захвату вирусных частиц, представлялось логичным протестировать декстраны в качестве ингибиторов взаимодействия ВИЧ с МР: этот рецептор связывает ВИЧ на поверхности макрофагов, опосредует захват вируса и транс-инфицирование Т клеток [104]. Так, были получены предварительные данные по влиянию декстранов на эндоцитоз ВИЧ в макрофагах. В макрофагах декстран и олигодекстран снижали заражение ВИЧ за 1 сутки примерно в 20 раз, то есть заражение макрофагов в данной модели было на 94% МР-зависимым. В более ранней работе других авторов получено значение 60% ингибирования [104]. Однако, несмотря на исходное снижение степени зараженности клеток, впоследствии количество вируса в клетках, получивших декстран, превысило контрольные значения, которые снизились и оказались ниже предела детекции.

Помимо анализа декстран-индуцированного снижения МР-зависимой инфекции в макрофагах, было интересно оценить влияние декстранов на результат заражения мононуклеаров периферической крови (МПК), среди которых есть как основные мишени ВИЧ инфекции, CD4⁺ Т лимфоциты, так и клетки (макрофаги, В клетки, дендритные клетки), обеспечивающие их транс-инфекцию через декстран-связывающие рецепторы (МР, DC-SIGN). По нашим предварительным данным декстран и олигодекстран снизили количество продуцируемых в среду вирусных частиц в 2 и 4 раза, соответственно. Данный феномен может быть интересен с точки зрения понимания возможных эффектов полисахаридов при инфекции.

Оценка эффекта полисахарида, способного блокировать МР и рецепторы семейства DC-SIGN, в модели ВИЧ *in vivo* была проведена ранее с использованием маннана [286]. Обезьяны, получавшие маннан в качестве микробицидного геля для предотвращения заражения ВИЧ половым путем, были инфицированы с той же эффективностью, что и контрольная группа.

Другие способы введения не исследовались. Таким образом, до сих пор неясно, способны ли блокаторы MP и DC-SIGN влиять на патогенез ВИЧ инфекции *in vivo*.

4.2. Влияние декстранов на цитокиновый ответ на микобактерии *in vitro* и *in vivo*

Роль макрофагов и их рецепторов в развитии цитокинового ответа при туберкулезе

При туберкулезе легких основные клетки, зараженные микобактериями, включают альвеолярные макрофаги и клетки, мигрирующие в место заражения: нейтрофилы, моноциты, интерстициальные макрофаги и дендритные клетки [287]. Первыми клетками, которые поглощают микобактерии при заражении воздушно-капельным путем, считаются альвеолярные макрофаги, хотя в дальнейшем не являются основным типом зараженных клеток [287, 288]. При этом макрофаги считают главными регуляторами иммунного ответа в гранулемах [289].

В патогенезе туберкулеза большую роль играет способность микобактерий регулировать функции захвативших их макрофагов [290]. Реакция макрофагов на заражение включает активацию, внутриклеточную деградацию микобактерий (реализуется не всегда) и регуляцию активности других иммунных клеток. Изменение этой реакции может существенно влиять на жизнеспособность микобактерий и определять течение и исход патологического процесса [290].

Рецепторы макрофагов, опосредующие связывание и захват МБТ, включают лектины С-типа MP, дектин 1, дектин 2, минкл, MCL, DC-SIGN и скэвенджер рецепторы включая SR-A и MARCO, которые не только распознают микобактерии, но и активируют их захват. Кроме этого в связывании и распознавании микобактерий на поверхности клеток участвуют рецептор CD14 и рецепторы семейства TLR: 1/2, 2/6, 4, 5 и 9, а внутри клеток рецепторы NOD1, NOD2, и галектин 3. Помимо этого, макрофаги распознают бактерии, опсонизированные белками SP-A, SP-D, MBL и компонентами комплемента C1q, C3, C3b и C4 при помощи С рецепторов (C1qR, CR3 и CR4) и Fcc рецепторов (FccR I-III) [9, 10]. Результатами связывания бактерий являются их захват и активация различных сигнальных путей, регулирующих миграцию клеток и иммунный ответ.

Цитокиновый ответ макрофагов на микобактериальную инфекцию регулирует аутокринным и паракринным образом функции иммунокомпетентных клеток в очаге туберкулезного поражения. Для анализа цитокинового ответа макрофагов нами были выбраны цитокины, определяющие антогонистические реакции. ИФН- γ участвует в активации макрофагов по типу M1, а Т хелперов - по типу Th1 [291]. Такой тип активации способствует внутриклеточной гибели микобактерий [292]. ИЛ-10, наоборот, подавляет продукцию ИФН- γ , активирует макрофаги по типу M2, а Т хелперы по типу Th2 [291]. Это позволяет микобактериям персистировать внутриклеточно. Th2 ответ активирует механизмы репарации

ткани, приводит к появлению повышенного числа фибробластов в зоне поражения и избыточной продукции компонентов межклеточного матрикса (фиброгенезу) [293]. Соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 анализируют как параметр, определяющий смещение иммунного ответа в сторону Th1, либо Th2 [17].

При туберкулезе маннозный рецептор принимает участие в захвате микобактерий в клетки [101, 102], а активируемые им сигнальные пути приводят к ингибированию фагосомально-лизосомального слияния [103] и ограничение Th1 ответа [16]. Поэтому мы предполагали, что декстран и олигодекстран, за счет взаимодействия с МР, смогут повлиять на цитокиновую реакцию человеческих макрофагов. Действительно, макрофаги в наших условиях экспрессировали ген рецептора МР (проверено методом ОТ-ПЦР, значения Ct от 32 до 37) и не экспрессировали ген рецептора DC-SIGN (проверено методом ОТ-ПЦР, Ct>40; при калибровке с использованием ампликонов Ct=6–20, эффективность реакции 1,896), что согласуется с литературными данными [294].

В данном разделе работы мы в целом показали, что декстран и олигодекстран, применяемые в качестве лекарства и пищевой добавки, могут выступать как модуляторы иммунного ответа при заражении макрофагов человека микобактериями. Это согласуется с двойной ролью лектинов С типа, одновременно играющих сигнальную роль и отвечающих за фагоцитоз [255]. Необходимо отметить, что блокада декстран-связывающих рецепторов при заражении иммунных клеток микобактериями может приводить к снижению степени заражения [102, 121]. Это могло быть дополнительной причиной модуляции иммунного ответа зараженных макрофагов.

Влияние декстранов на цитокиновый ответ МБТ-инфицированных макрофагов

Инкубация макрофагов с декстраном и олигодекстраном влияла на базальную продукцию ИФН- γ незначительно (Рисунок 14). Концентрация ИФН- γ в среде зараженных клеток на первые сутки после заражения оставалась без изменений вне зависимости от добавления исследуемых веществ. На 7 сутки инфицированные клетки продуцировали в среду в среднем несколько больше ИФН- γ , чем неинфицированные, что согласуется с данными других исследователей [247, 248]. Добавление к зараженным клеткам исследуемых веществ: декстрана, олигодекстрана и маннозы приводило к незначительному росту продукции ИФН- γ на 7 сутки.

Добавление олигодекстрана значительно повышало продукцию ИЛ-10 в незараженных клетках (значимые различия на 1 сутки, в 18 раз; не значимые, но выраженные различия на 7 сутки). Это интересно, так как олигодекстраны (изомальтоолигосахариды) используются в качестве пищевой добавки. Повышение продукции ИЛ-10 может служить механизмом, благодаря которому олигодекстраны/изомальтоолигосахариды при добавлении в пищу влияют

на микрофлору и течение инфекций, поражающих желудочно-кишечный тракт [13]. Добавление к культивируемым клеткам декстрана 66 влияло на продукцию ИЛ-10 макрофагами на 1 и 7 сутки инкубации незначительно (Рисунок 14).

Помимо абсолютных значений концентраций исследуемых цитокинов было проанализировано соотношение концентраций ИФН- γ /ИЛ-10. Это соотношение положительно коррелирует с клиническими улучшениями при лечении туберкулезной инфекции [18], и имеет характерный разброс значений. В работе [18] его приводят для измерений концентраций цитокинов (на сроке 2 суток для ИЛ-10 и 5 суток для ИФН- γ) в стимулированной микобактериальными антигенами культуре клеток цельной крови. У пациентов с диссеминированным или тяжелым туберкулезом индекс составлял 0,17-0,21, у пациентов с легочным туберкулезом 0,69-0,85, у здоровых доноров 19-22. Другой автор, работая с мононуклеарными клетками периферической крови пациентов, стимулированными антигенами микобактерий, и измеряя уровень цитокинов на 6 день, также отмечает более высокий показатель ИФН- γ /ИЛ-10 у здоровых доноров [295]. В работе со ссылкой на ряд других исследований значения этого индекса на уровне ИФН- γ /ИЛ-10 >2 были приняты ассоциированными с про-Th1 уклоном иммунного ответа, значения ИФН- γ /ИЛ-10 $<0,3$ приняты ассоциированными с противовоспалительным уклоном иммунного ответа, а промежуточные значения приняты значениями без определенного уклона иммунного ответа.

Подсчет соотношения концентраций ИФН- γ /ИЛ-10 показал, что оно менялось в зависимости от добавляемых к клеточным культурам соединений и от инфицированности культур, но все данные изменения не были статистически значимы (Рисунок 14). Заражение клеток на 1 сутки мало влияло на это соотношение, но можно отметить самые низкие показатели у зараженных клеток, не получавших никакие вещества. На 7 сутки параметр ИФН- γ /ИЛ-10 был в среднем в 2 раза больше у зараженных клеток, чем у неинфицированных. Добавление к культуре макрофагов декстрана на 7 сутки приводило росту соотношения ИФН- γ /ИЛ-10 в среднем в 2,5 раза (однако различия не были статистически значимы). Незараженные клетки не отвечали на добавление декстрана изменением продукции цитокинов, что может свидетельствовать об избирательном влиянии декстрана на зараженные клетки.

Повышение соотношения ИФН- γ /ИЛ-10 в 5,1 раз при добавлении декстрана к макрофагам человека, зараженным H37Rv (при объединении данных, полученных для 1 и 7 суток инкубации, $P=0,07$), можно считать важным свидетельством смещения иммунного ответа в сторону про-Th1 ответа. Исходные данные были проанализированы методами байесовской статистики с тем, чтобы принять или отклонить нулевую гипотезу. Анализ различий между двумя группами ($N_1=4$, $N_2=4$) при $t= 1.673$ свидетельствует в пользу альтернативной гипотезы, фактор байеса $K= 1.296515$.

Влияние декстранов на цитокиновый ответ макрофагов на ManLAM

Компонент клеточной стенки микобактерий ManLAM при попадании во внеклеточный матрикс меняет профиль активации иммунных клеток. Этот маннозилированный липид, взаимодействует с рецепторами MP [16], DC-SIGN [14] и влияет на миелоидные клетки, способствуя развитию противовоспалительного фенотипа и подавляя Th1 ответ. Мы исследовали, каким образом преинкубация клеток с декстранами влияет на цитокиновый ответ макрофагов после добавления ManLAM микобактерий H37Rv (Рисунок 19).

На первые сутки количество ИФН- γ и соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 в среде клеток, получавших декстран перед добавлением ManLAM, были в среднем выше в 2 раза, но различия не были статистически значимы (Рисунок 15). На седьмые сутки соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 в среде клеток, получавших олигодекстран и маннозу перед добавлением ManLAM, было в среднем выше более, чем в 4 раза, но различия также не были статистически значимы.

Влияние преинкубации с олигодекстраном и маннозой на действие ManLAM достаточно интересно. Так, например, связывание ManLAM с DC-SIGN дендритных клеток может ингибировать секрецию ИЛ-12 (цитокина, активирующего Th1 ответ), и активировать продукцию ИЛ-10 [149, 296]. При этом в макрофагах ManLAM, в отличие от декстрана, также активирует иммуносупрессорную программу [16]. В нашем случае, макрофаги, получившие ManLAM, имеют параметр ИФН- γ /ИЛ-10 в среднем несколько выше, чем не получившие.

Влияние декстранов на цитокиновый ответ макрофагов на M. bovis BCG

Микобактерии БЦЖ, используемые в составе противотуберкулезных вакцин, *in vivo* отличаются эффективной индукцией ИФН- γ , но в культуре макрофагов продукцию этого цитокина они не активируют [250]. Было интересно проверить, могут ли декстраны повлиять на изменение цитокинового ответа макрофагов на микобактерии БЦЖ (Рисунок 16).

Преинкубация с декстранами приводила к появлению тенденции к снижению продукции ИФН- γ , и повышению продукции ИЛ-10, как на 1, так и на 7 сутки. Несмотря на отсутствие статистически значимых отличий в содержании самих цитокинов в среде, олигодекстран статистически значимо снижал соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 на 1 сутки инкубации: более чем в 8 раз. На 7 сутки соотношение ИФН- γ /ИЛ-10, наоборот, показало тенденцию к росту в случае преинкубации как с декстраном, так и олигодекстраном; тенденцию к наибольшему росту вызвала преинкубация с маннозой (Рисунок 20). В частности, средний рост индекса ИФН- γ /ИЛ-10 составил для декстрана 3,4, а для олигодекстрана 16,8 раз; при этом в случае декстрана данный индекс еще в 1 сутки в среднем возрастал в 2,7 раза.

Смещение ИФН- γ /ИЛ-10 в сторону про-Th1 ответа в макрофагах, инфицированных микобактериями или получающих ManLAM микобактерий, при воздействии декстранов

Основной вывод по культуральным экспериментам данного раздела заключается в том, что декстран, вводимый перед заражением макрофагов человека живыми микобактериями туберкулеза вирулентного штамма H37Rv и микобактериями БЦЖ, а также добавление олигодекстрана перед добавлением компонента стенки микобактерий ManLAM заметно, хотя и статистически не значимо, повышают соотношение ИФН- γ /ИЛ-10.

Если обратиться к точным значениям, в культуре макрофагов человека добавление декстрана и олигодекстрана перед заражением микобактериями H37Rv повышает соотношение концентраций цитокинов ИФН- γ /ИЛ-10 в культуральной среде в 15 и 10 раз на 1 сутки и в 2,6 и 1,6 раз на 7 суток, соответственно. В абсолютных значениях это в 1 сутки изменение индекса от значения 0,25 к значениям 3,8 и 2,6, а в 7 суток изменение от значения 1,0 к значениям 2,6 и 1,6, соответственно. Инкубация с декстраном и олигодекстраном перед добавлением ManLAM на 7 суток повышает соотношение концентраций цитокинов ИФН- γ /ИЛ-10 в культуральной среде в 1,4 и 6,2 раз от значения 1,9 до значений 2,6 и 11,5. Инкубация с декстраном и олигодекстраном перед добавлением БЦЖ на 7 суток повышает соотношение концентраций цитокинов ИФН- γ /ИЛ-10 в культуральной среде в 3,4 и 16,8 раз от значения 0,39 до значений 1,4 и 6,6.

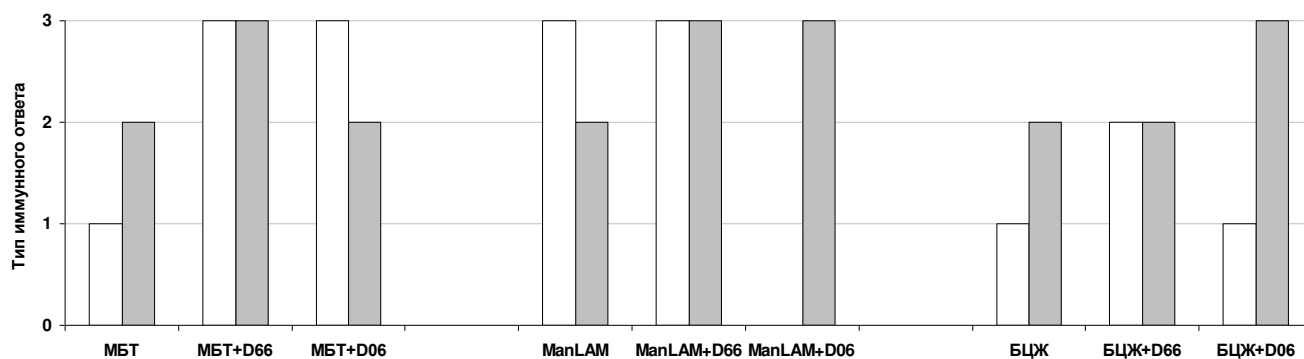


Рисунок 24. Декстраны увеличивают ИФН- γ /ИЛ-10, усиливая провоспалительный ответ

Примечание. Индекс ИФН- γ /ИЛ-10 при значениях менее 0,3 на схеме соответствует противовоспалительному типу иммунного ответа (обозначен как 1), при значениях 0,3–2,0 неопределенному типу (2), а при значениях более 2,0 — про-Th1 типу (3). Светлые столбцы: 1 сутки инкубации; темные столбцы: 7 суток инкубации.

Используя предложенную ранее шкалу значений индекса ИФН- γ /ИЛ-10 [295] для оценки полученных результатов, можно заключить следующее (Рисунок 24):

Преинкубация макрофагов с декстраном перед заражением МБТ H37Rv на первый день меняет характер иммунного ответа с противовоспалительного уклона (ИФН- γ /ИЛ-10 $<0,3$), на ответ с про-Th1 уклоном (ИФН- γ /ИЛ-10 >2), на седьмые сутки влияние аналогичное для олигодекстрана и подобное для декстрана. Инкубация с декстраном и олигодекстраном перед добавлением ManLAM на седьмые сутки меняет характер иммунного ответа с неопределенного (0,3 $<$ ИФН- γ /ИЛ-10 <2), на ответ с про-Th1 уклоном. Инкубация с веществами при добавлении БЦЖ меняет характер иммунного ответа на 1 сутки с противовоспалительного на неопределенный (декстран) и на 7 сутки с неопределенного на про-Th1 (олигодекстран). Таким образом, во всей серии экспериментов декстраны в среднем смещали тип иммунного ответа исключительно в сторону про-Th1, а наиболее выраженные изменения оказал декстран при заражении культуры клеток *M. tuberculosis* H37Rv. Здесь было обнаружено статистически значимое (при объединении данных, полученных для 1 и 7 суток инкубации, P=0,07) повышение соотношения ИФН- γ /ИЛ-10 при добавлении декстрана к макрофагам человека, зараженным H37Rv.

Влияние декстранов на экспрессию генов цитокинов макрофагами

Отличия между контрольными и опытными образцами не были статистически значимы, но выявленные тенденции имели закономерный характер. Для большинства образцов, соответствующих 1 суткам инкубации, количество мРНК ИФН- γ было ниже предела детекции, поэтому значения на графике (Рисунок 17) дают лишь оценку значения сверху. На 7 сутки значительных различий в увеличившейся продукции ИФН- γ обнаружено не было.

В зараженных клетках, получивших олигодекстран, отмечена тенденция к повышению уровня экспрессии гена ИЛ-10 на 1 сутки (в среднем в 8 раз), при этом добавление декстрана, наоборот, привело к снижению экспрессии гена ИЛ-10 (в среднем в 20 раз) (Рисунок 18). Полученные данные хорошо согласуются с данными ИФА (Рисунок 14). Незначительные отличия в экспрессии гена ИЛ-10 между зараженными и незараженными клетками на 1 сутки согласуются с литературными данными (отличие в 3 раза) [297].

Было проверено влияние декстранов на экспрессию гена ТФР- β 1, так как это один из важнейших факторов, определяющих как патогенез туберкулеза, так и перестройку внеклеточного матрикса. На 7 сутки добавление декстрана и олигодекстрана к зараженным клеткам вызывали тенденцию к снижению уровня мРНК ТФР- β 1 в 1051 и 57 раз, соответственно. В зараженных клетках экспрессия ТФР- β 1 была незначительно выше контрольного уровня — в среднем в 2,5 и 4 раза на 1 и 7 сутки (Рисунок 19), что согласуется с литературными данными (рост экспрессии в 8 раз) [297].

Антагонисты ТФР- β 1 исследуются в качестве потенциальных дополнительных противотуберкулезных препаратов [298]: известна важная роль ТФР- β 1 в патогенезе туберкулеза — он накапливается в местах инфекционного поражения, подавляет Т-клеточный ответ и микробицидные функции макрофагов [299]. Кроме этого, ТФР- β 1 — один из ключевых факторов фиброгенеза, и его повышенный уровень ассоциирован с фиброзированием легких при туберкулезе [300]. Обнаруженная в работе тенденция декстранов снижать индуцированную микобактериями продукцию ТФР- β 1 может являться механизмом, через который препарат изониазид-декстран снижал БЦЖ-индуцированный гранулемогенез и фиброгенез в моделях *in vivo* [218, 301]. При этом сигналы через МР действительно влияют на уровень продукции ТФР- β 1, так, например, манноза подавляет его LPS-индуцированную продукцию [302].

Влияние декстрана на цитокиновый ответ на микобактерии in vivo

Выбранная в работе модель аналогична интраназальному или ингаляционному введению противотуберкулезных вакцин на основе микобактерий. Добавление декстрана к суспензии микобактерий позволило оценить его возможные адьювантные свойства, а также, предположительно, оценить роль декстран-связывающих рецепторов (МР и рецепторы семейства DC-SIGN) при туберкулезной инфекции.

Выбор срока, через который забирали органы — 48 часов — был основан на том, что к этому моменту уровень цитокинов после заражения микобактериями возрастает и становится измерим [239, 240]. В работе использовали инактивированные микобактерии туберкулеза, и минимальный срок для забора органов был выбран с целью снизить возможное расхождение результатов по сравнению с живыми микобактериями.

Мы предполагаем, что декстран, связывая часть рецепторов, изменяет характер распознавания микобактерий, в частности, ингибирует сигналы, подаваемые через маннозный рецептор, и блокирующие Th1 ответ. Главный вывод по экспериментам с интраназальным введением декстрана мышам, получившим микобактерии H37Rv, состоит в том, что декстран снижал концентрации ИФН- γ и ИЛ-10 в легких, но при этом, аналогично эффекту, выявленному *in vitro*, в среднем повышал соотношение ИФН- γ /ИЛ-10 (в 10,5 раз с 0,22 до 2,4). Если использовать предложенную шкалу значений индекса [295] для оценки полученных результатов, то произошло переключение с более выраженного противовоспалительного уклона иммунного ответа на менее выраженный про-Th1 уклон. Это может свидетельствовать о формировании готовности макрофагов реагировать по типу, благоприятному для формирования противотуберкулезного иммунитета.

В контексте полученных данных интересен тот факт, что продукция ИФН- γ в ответ на микобактериальный антиген после введения вакцин БЦЖ, содержащих и не содержащих

декстран, различна. Так, введение вакцины, содержащей декстран, приводило к повышенному уровню продукции ИФН- γ клетками крови при стимуляции антигеном. Эти данные могут свидетельствовать о более выраженной активации Th1 ответа на возбудитель уже после вакцинации декстран-содержащим препаратом [303].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

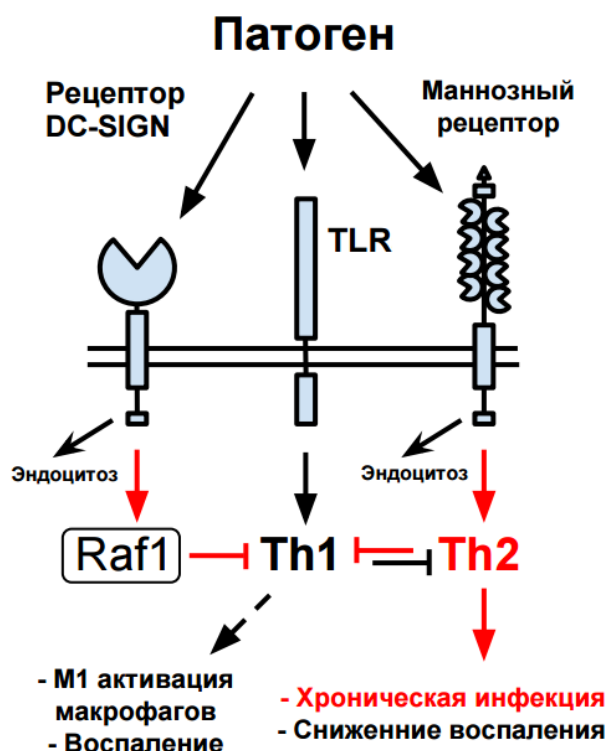
Биологические эффекты декстранов, связанные с их рецепторной специфичностью, мало изучены. В данной работе впервые исследовано рецептор-специфичное действие декстранов и показано ингибирование эндоцитоза модельного патогена (ВИЧ) через рецептор DC-SIGN. В работе впервые изучена способность декстрана в качестве лиганда рецептора MR модулировать цитокиновый ответ на модельный патоген (микобактерии туберкулеза).

Предпосылками к проведению работы послужили результаты исследований, проведенных на моделях БЦЖ-гранулематоза, в которых окисленный декстран проявлял иммуномодулирующие свойства и высокий защитный потенциал. Анализируя возможные механизмы действия декстрана, мы предположили, что эти результаты могут быть связаны с рецептор-зависимым захватом декстранов через декстран-связывающие рецепторы, прежде всего, маннозный рецептор макрофагов (MR) и рецептор DC-SIGN.

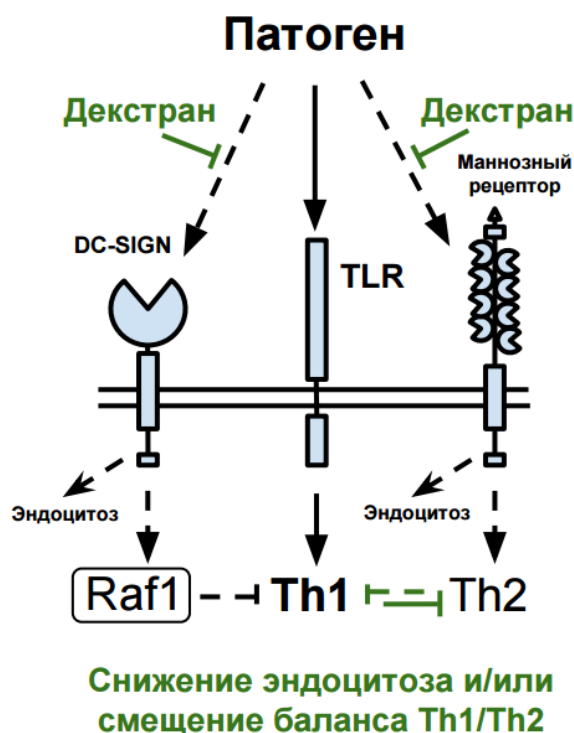
В наших исследованиях удалось показать, что декстраны способны ингибировать взаимодействие маннозилированного белка с рецептором DC-SIGN в бесклеточной модели. Затем в культуральных моделях нами было установлено, что декстран способен ингибировать DC-SIGN-зависимый эндоцитоз ВИЧ. Максимально достижимый уровень ингибирования составил 86%. Таким образом, гипотеза о том, что декстраны способны препятствовать входу патогенов в клетки через рецептор DC-SIGN, была проверена и подтверждена.

В дальнейших исследованиях мы продемонстрировали, что декстран, вводимый в культуральную среду перед заражением макрофагов микобактериями туберкулеза штамма H37Rv и микобактериями БЦЖ повышает соотношение ИФН- γ /ИЛ-10. Было показано, что одновременное введение декстрана вместе с микобактериями в легкие мыши приводит к значимому увеличению соотношения ИФН- γ /ИЛ-10, ассоциированного с благоприятным течением туберкулеза [18]. Таким образом, была проверена и подтверждена гипотеза о том, что декстран может модулировать иммунную реакцию на патогены. Под действием декстрана иммунная реакция при заражении культуры макрофагов и легких экспериментальных животных смещается в сторону про-Th1 ответа, что соответствует представлениям о роли лектинов С-типа в ограничении Th1 ответа и возможности декстранов блокировать данные рецепторы. В результате была составлена концептуальная схема действия декстранов в качестве конкурентных ингибиторов лектинов С-типа при инфекциях (Рисунок 25). Роль декстранов при инфекциях может выражаться в снижении эндоцитоза патогенов, а также в модуляции иммунного ответа: в частности, в регуляции баланса между Th1 и Th2 ответами.

А. Современные данные



Б. Схема модуляции



→ Стимулирующее влияние —| Тормозящее влияние - → Ослабленное влияние

Рисунок 25. Концептуальная схема влияния декстранов на патогенетические процессы при инфекционных заболеваниях

Примечание. А. Взаимодействие DC-SIGN и маннозного рецептора с патогенами опосредует их эндоцитоз и ограничивает развитие иммунного ответа Th1 типа, что может вести к хронизации инфекции. Б. В данной работе показано, что декстран является эффективным ингибитором DC-SIGN. В работе на моделях ВИЧ и туберкулеза показано, что декстран способен DC-SIGN-зависимо снижать эндоцитоз ВИЧ и модулировать иммунный ответ на микобактерии, повышая соотношение ИФН- γ /ИЛ-10, ассоциированное с развитием про-Th1 иммунного ответа.

TLR — толл-подобные рецепторы, Raf1 — прото-онкоген серин/треонин-протеинкиназа

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения декстранов в качестве блокаторов рецепторов и иммуномодуляторов при инфекциях, зависимых от декстран-связывающих рецепторов. Данная работа меняет представление о декстранах, как о биологически инертных соединениях, используемых в медицине, демонстрируя неизвестные ранее механизмы влияния декстрана на патогенез инфекционных процессов. Учитывая доступность и безопасность декстранов, поиск их биомедицинских применений в новом контексте может стать предметом дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. В бесклеточной модели декстран и олигодекстран ингибируют взаимодействие рецептора DC-SIGN с маннозилированным белком. Получены значения IC_{50} для декстрана: $35,4 \pm 1,6$ мкМ и олигодекстрана: $4,07 \pm 0,07$ мМ. Полученные значения свидетельствуют об аффинности декстранов к DC-SIGN, сопоставимой с аффинностью других углеводных лигандов.

2. Декстран и олигодекстран в клеточной модели снижают активность DC-SIGN-зависимого эндоцитоза ВИЧ-1. Получены значения EC_{50} для декстрана: 50 мкМ и олигодекстрана: 5,7 мМ, хорошо согласующиеся с данными бесклеточной модели. Максимальная эффективность блокады DC-SIGN-зависимой интернализации ВИЧ для декстрана и олигодекстрана — 75% и 86% — недостаточна для их применения в качестве ингибиторов входа вируса в клетки. Установлен механизм вмешательства декстрана в DC-SIGN-зависимое взаимодействие патогена с клеткой на примере ВИЧ.

3. В модели заражения макрофагов *M. tuberculosis* декстран вызывает повышение соотношения ИФН- γ /ИЛ-10 на сроках 1 и 7 суток в среднем в 5,1 раз, что свидетельствует об усилении про-Th1 иммунного ответа. Выявлена способность декстранов при микобактериальной инфекции вызывать функциональную поляризацию макрофагов, способствующую формированию противотуберкулезной резистентности.

4. Олигодекстран индуцирует продукцию в макрофагах ИЛ-10 на первые сутки намного эффективнее (рост концентрации в 18 раз), чем декстран (тенденция к росту в 2,5 раза), что свидетельствует о существенных различиях иммуномодулирующих свойств и механизмов действия декстрана и олигодекстрана.

5. В модели острой туберкулезной инфекции декстран повышает индекс ИФН- γ /ИЛ-10 более чем в 10 раз, смещая иммунную реакцию в сторону про-Th1 ответа, и проявляя иммуномодулирующие свойства потенциально благоприятные для формирования противотуберкулезной резистентности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АПК – антиген-представляющие клетки
- БЦЖ – бацилла Кальметта-Герена, штамм микобактерии *bovis*, используемый для приготовления противотуберкулезных вакцин
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ВИЧ-1 – ВИЧ типа 1
- ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
- ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- ДИ – доверительный интервал
- ДК – дендритные клетки
- ИЛ-4 – интерлейкин 4
- ИФН- γ – интерферон гамма
- МБТ – микобактерии туберкулёза
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
- МоДК – дендритные клетки, полученные из моноцитов
- МФ – макрофаги
- НАДФН – никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат
- п.н. – пара нуклеотидов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ТБ – туберкулёз
- ТОРС – тяжелый острый респираторный синдром
- ТФР- β 1 – трансформирующий фактор роста β 1
- ФНО- α – фактор некроза опухолей-альфа
- — —
- Cdc42 – гомолог белка контроля клеточного деления
- CLIC – клатрин-независимые переносчики (clathrin-independent carriers)
- CLR – лектиноподобные рецепторы C-типа
- DC-SIGN – рецептор дендритных клеток (dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin)
- DFRs – рецепторы семейства DC-SIGN
- D-Glc – D-глюкоза
- EC₅₀ – концентрация соединения, обеспечивающая 50% от полного эффекта
- FITC – флуоресцеинизотиоцианат

GEEC – гликозилфосфатидилинозитол-богатые эндосомальные компартменты
(glycosylphosphatidylinositol-enriched endocytic compartments)

gp120 – гликопротеин оболочки ВИЧ

HTLV-1 – Т-лимфотропный вирус человека 1

IC₅₀ – концентрация соединения, обеспечивающая 50% ингибирования

ICAM-3 – молекулы межклеточной адгезии-3

LSEC – эндотелиальные клетки синусоидов печени

L-SIGN – гомолог DC-SIGN печени и лимфатического эндотелия

M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор

MP – маннозный рецептор (CD206)

ОД – окисленный декстран

Raf1 – прото-онкоген серин/треонин-протеинкиназа

SARS – тяжелый острый респираторный синдром

SIGN-R1 (R2, ... R8) – мышьиные гомологи DC-SIGN

SIV – вирус иммунодефицита обезьян

SPF – свободные от видоспецифических патогенов (specific pathogen free)

Th – Т-хелпер

Th1 (2) – Т-хелперы 1 (2) типа

TLR – толл-подобные рецепторы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Покровский В. В., Ладная Н. Н., Соколова Е. В. ВИЧ-инфекция и туберкулез в России: «оба хуже» // Туберкулез и болезни легких. – 2014. № 6. – С. 3-8.
2. Yablonskii P. K., Vigel A. A., Galkin V. B., Shulgina M. V. Tuberculosis in Russia. Its History and Its Status Today // American journal of respiratory and critical care medicine. – 2015. – Т. 191, № 4. – С. 372-376.
3. Schomburg I., Chang A., Placzek S., Söhngen C., Rother M., Lang M., Munaretto C., Ulas S., Stelzer M., Grote A., Scheer M., Schomburg D. BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA // Nucleic Acids Research. – 2013. – Т. 41, № Database issue. – С. D764-772.
4. Yimer G., Gry M., Amogne W., Makonnen E., Habtewold A., Petros Z., Aderaye G., Schuppe-Koistinen I., Lindquist L., Aklillu E. Evaluation of patterns of liver toxicity in patients on antiretroviral and anti-tuberculosis drugs: a prospective four arm observational study in ethiopian patients // PLoS ONE. – 2014. – Т. 9, № 4. – С. e94271.
5. Hoving J. C., Wilson G. J., Brown G. D. Signalling C-Type lectin receptors, microbial recognition and immunity // Cellular microbiology. – 2014. – Т. 16, № 2. – С. 185-194.
6. Geijtenbeek T. B., van Kooyk Y. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity // Apmis. – 2003. – Т. 111. – С. 698-714.
7. Garcia-Nieto S., Johal R. K., Shakesheff K. M., Emara M., Royer P. J., Chau D. Y., Shakib F., Ghaemmaghami A. M. Laminin and fibronectin treatment leads to generation of dendritic cells with superior endocytic capacity // PLoS ONE. – 2010. – Т. 5.
8. Takahara K., Yashima Y., Omatsu Y., Yoshida H., Kimura Y., K'Ang Y. S., Steinman R. M., Park C. G., Inaba K. Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins // Int Immunol. – 2004. – Т. 16. – С. 819-29.
9. Guirado E., Schlesinger L. S., Kaplan G. Macrophages in tuberculosis: friend or foe // Seminars in immunopathology. – 2013. – Т. 35. – С. 563-583.
10. Weiss G., Schaible U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria // Immunological reviews. – 2015. – Т. 264, № 1. – С. 182-203.
11. Almeida A. S., Lago P. c. M., Boechat N., Huard R. C., Lazzarini L. C. O., Santos A. R., Nociari M., Zhu H., Perez-Sweeney B. M., Bang H. Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity // The Journal of Immunology. – 2009. – Т. 183, № 1. – С. 718-731.

12. Soilleux E. J., Morris L. S., Leslie G., Chehimi J., Luo Q., Levroney E., Trowsdale J., Montaner L. J., Doms R. W., Weissman D., Coleman N., Lee B. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2002. – T. 71, № 3. – C. 445-457.
13. Zhang X. S., Brondyk W., Lydon J. T., Thurberg B. L., Piepenhagen P. A. Biotherapeutic target or sink: analysis of the macrophage mannose receptor tissue distribution in murine models of lysosomal storage diseases // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2011. – T. 34, № 3. – C. 795-809.
14. Geijtenbeek T. B., Van Vliet S. J., Koppel E. A., Sanchez-Hernandez M., Vandenbroucke-Grauls C. M., Appelmelk B., Van Kooyk Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function // *J Exp Med*. – 2003. – T. 197, № 1. – C. 7-17.
15. Steeghs L., Van Vliet S. J., Uronen-Hansson H., Van Mourik A., Engering A., Sanchez-Hernandez M., Klein N., Callard R., Van Putten J. P. M., Van Der Ley P. Neisseria meningitidis expressing IgtB lipopolysaccharide targets DC-SIGN and modulates dendritic cell function // *Cellular microbiology*. – 2006. – T. 8, № 2. – C. 316-325.
16. Chieppa M., Bianchi G., Doni A., Del Prete A., Sironi M., Laskarin G., Monti P., Piemonti L., Biondi A., Mantovani A., Introna M., Allavena P. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program // *J Immunol*. – 2003. – T. 171. – C. 4552-60.
17. Newton M. R., Askeland E. J., Andresen E. D., Chehval V. A., Wang X., Askeland R. W., O'Donnell M. A., Luo Y. Anti-interleukin-10R1 monoclonal antibody in combination with bacillus Calmette-Guérin is protective against bladder cancer metastasis in a murine orthotopic tumour model and demonstrates systemic specific anti-tumour immunity // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2014. – T. 177, № 1. – C. 261-268.
18. Jamil B., Shahid F., Hasan Z., Nasir N., Razzaki T., Dawood G., Hussain R. Interferon-gamma/IL-10 ratio defines the disease severity in pulmonary and extra pulmonary tuberculosis // *Tuberculosis*. – 2007. – T. 87, № 4. – C. 279-287.
19. Atik M. Dextran, their use in surgery and medicine: With emphasis on the low molecular weight fractions // *Anesthesiology*. – 1966. – T. 27. – C. 425-438.
20. Sidebotham R. L. Dextran // *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. – 1974. – T. 30. – C. 371-444.
21. Belder A. N. Dextran, Handbook // Amersham Biosciences. – 2003.
22. Heinze T., Liebert T., Heublein B., Hornig S., Klemm D. Functional Polymers Based on Dextran // *Polysaccharides II* Springer Berlin Heidelberg, 2006. – C. 199-291.
23. Gronwall A., Ingelman B. Dextran as a substitute for plasma // *Nature*. – 1945. – T. 155. – C. 45-45.

24. Ingelman B. Dextran and its use as a plasma substitute // *Acta chem. scand.* – 1947. – T. 1. – C. 731-738.
25. Humphrey J. H. Tolerogenic or immunogenic activity of hapten-conjugated polysaccharides correlated with cellular localization // *Eur J Immunol.* – 1981. – T. 11, № 3. – C. 212-20.
26. Amlot P. L., Grennan D., Humphrey J. H. Splenic dependence of the antibody response to thymus-independent (TI-2) antigens // *Eur J Immunol.* – 1985. – T. 15, № 5. – C. 508-12.
27. Mangar D., Gerson J. I., Baggish M. S., Camporesi E. M. Serum levels of Hyskon during hysteroscopic procedures // *Anesthesia & Analgesia.* – 1991. – T. 73, № 2. – C. 186-189.
28. Rein M. S., Hill J. A. 32% dextran 70 (Hyskon) inhibits lymphocyte and macrophage function in vitro: a potential new mechanism for adhesion prevention // *Fertil Steril.* – 1989. – T. 52, № 6. – C. 953-7.
29. Rouleau L., Rossi J., Leask R. L. Concentration and time effects of dextran exposure on endothelial cell viability, attachment, and inflammatory marker expression in vitro // *Annals of biomedical engineering.* – 2010. – T. 38, № 4. – C. 1451-1462.
30. Jarstrand C., Lahnborg G., Berghem L. Human granulocyte function during dextran infusion // *Acta chirurgica Scandinavica. Supplementum.* – 1978. – T. 489. – C. 279-286.
31. Vulcano M., Albanesi C., Stoppacciaro A., Bagnati R., D'Amico G., Struyf S., Transidico P., Bonecchi R., Del Prete A., Allavena P. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo // *European journal of immunology.* – 2001. – T. 31, № 3. – C. 812-822.
32. Viebig N. K., Andrews K. T., Kooyk Y. v., Lanzer M., Knolle P. A. Evaluation of the role of the endocytic receptor L-SIGN for cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes // *Parasitology Research.* – 2005. – T. 96, № 4. – C. 247-252.
33. Geijtenbeek T. B., Groot P. C., Nolte M. A., van Vliet S. J., Gangaram-Panday S. T., van Duijnhoven G. C., Kraal G., van Oosterhout A. J., van Kooyk Y. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo // *Blood.* – 2002. – T. 100. – C. 2908-16.
34. Rodriguez A., Regnault A., Kleijmeer M., Ricciardi-Castagnoli P., Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells // *Nature Cell Biology.* – 1999. – T. 1, № 6. – C. 362-368.
35. East L., Isacke C. M. The mannose receptor family // *Biochim Biophys Acta.* – 2002. – T. 1572. – C. 364-86.
36. Cambi A., Beeren I., Joosten B., Fransen J. A., Figdor C. G. The C type lectin DC SIGN internalizes soluble antigens and HIV 1 virions via a clathrin dependent mechanism // *European journal of immunology.* – 2009. – T. 39. – C. 1923-1928.

37. Navarrete A.-M., Delignat S., Teillaud J.-L., Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S. B. b., Bayry J. CD4+ CD25+ regulatory T cell-mediated changes in the expression of endocytic receptors and endocytosis process of human dendritic cells // *Vaccine*. – 2011. – T. 29. – C. 2649-2652.
38. Sallusto F., Cella M., Danieli C., Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products // *J Exp Med*. – 1995. – T. 182. – C. 389-400.
39. Piemonti L., Monti P., Allavena P., Leone B. E., Caputo A., Di Carlo V. Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells // *Int Immunol*. – 1999. – T. 11. – C. 1519-26.
40. Knolle P. A., Uhrig A., Hegenbarth S., Loser E., Schmitt E., Gerken G., Lohse A. W. IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules // *Clin Exp Immunol*. – 1998. – T. 114. – C. 427-33.
41. Kang Y. S., Yamazaki S., Iyoda T., Pack M., Bruening S. A., Kim J. Y., Takahara K., Inaba K., Steinman R. M., Park C. G. SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran // *Int Immunol*. – 2003. – T. 15. – C. 177-86.
42. Araki N., Hatae T., Yamada T., Hirohashi S. Actinin-4 is preferentially involved in circular ruffling and macropinocytosis in mouse macrophages: analysis by fluorescence ratio imaging // *Journal of Cell Science*. – 2000. – T. 113, № 18. – C. 3329-3340.
43. Garrett W. S., Chen L.-M., Kroschewski R., Ebersold M., Turley S., Trombetta S., Galan J. E., Mellman I. Developmental Control of Endocytosis in Dendritic Cells by Cdc42 // *Cell*. – 2000. – T. 102, № 3. – C. 325-334.
44. Schroder U., Arfors K. E., Tangen O. Stability of fluorescein labeled dextrans *in vivo* and *in vitro* // *Microvascular Research*. – 1976. – T. 11. – C. 33-39.
45. Ohkuma S., Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1978. – T. 75, № 7. – C. 3327-3331.
46. Sheedy F. J., Grebe A., Rayner K. J., Kalantari P., Ramkhelawon B., Carpenter S. B., Becker C. E., Ediriweera H. N., Mullick A. E., Golenbock D. T., Stuart L. M., Latz E., Fitzgerald K. A., Moore K. J. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation // *Nature Immunology* – T. 14, № 8. – C. 812-820.
47. Gaudin R. l., Berre S., Cunha de Alencar B., Decalf J. r. m., Schindler M., Gobert F. o.-X., Jouve M., Benaroch P. Dynamics of HIV-Containing Compartments in Macrophages Reveal Sequestration of Virions and Transient Surface Connections // *PLoS ONE* – T. 8, № 7.

48. Fiegl D., Kagebein D., Liebler-Tenorio E. M., Weisser T., Sens M., Gutjahr M., Knittler M. R. Amphisomal Route of MHC Class I Cross-Presentation in Bacteria-Infected Dendritic Cells // *The Journal of Immunology*. – 2013. – T. 190, № 6. – C. 2791-2806.
49. Zhang Z., Meng Y., Guo Y., He X., Li'u Q., Wan'g X., Shan F. *Rehmannia glutinosa* polysaccharide induces maturation of murine bone marrow derived Dendritic cells (BMDCs) // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. – T. 54. – C. 136-143.
50. Bauer R., Mezger M., Blockhaus C., Schmitt A.-L., Kurzai O., Einsele H., Loeffler J. 40-O-[2-Hydroxyethyl] rapamycin modulates human dendritic cell function during exposure to *Aspergillus fumigatus* // *Journal of Basic Microbiology*. – 2011. – T. 52, № 3. – C. 269-276.
51. Commisso C., Davidson S. M., Soydaner-Azeloglu R. G., Parker S. J., Kamphorst J. J., Hackett S., Grabocka E., Nofal M., Drebin J. A., Thompson C. B., Rabinowitz J. D., Metallo C. M., Vander Heiden M. G., Bar-Sagi D. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells // *Nature* – T. advance online publication.
52. Hope J. C., Guzman E., Cubillos-Zapata C., Stephens S. A., Gilbert S. C., Prentice H., Sopp P., Howard C. J., Charleston B. Migratory sub-populations of afferent lymphatic dendritic cells differ in their interactions with *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette Guerin // *Vaccine*. – 2011. – T. 30, № 13. – C. 2357-2367.
53. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I. S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis // *Biochemical Journal*. – 2004. – T. 377, № Pt 1. – C. 159-169.
54. Martinez-Pomares L. The mannose receptor // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2012. – T. 92, № 6. – C. 1177-1186.
55. Le Cabec V., Emorine L. J., Toesca I., Cougoule C., Maridonneau-Parini I. The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor // *J Leukoc Biol*. – 2005. – T. 77, № 6. – C. 934-43.
56. Leitinger B., Hohenester E. Mammalian collagen receptors // *Matrix Biol*. – 2007. – T. 26, № 3. – C. 146-55.
57. Garcia-Vallejo J. J., van Kooyk Y. DC-SIGN. C-Type Lectin with Prominent Role in Immune System // *Glycoscience: Biology and Medicine* Springer, 2015. – C. 649-659.
58. Cheong C., Matos I., Choi J.-H., Dandamudi D. B., Shrestha E., Longhi M. P., Jeffrey K. L., Anthony R. M., Kluger C., Nchinda G. Microbial Stimulation Fully Differentiates Monocytes to DC-SIGN/CD209+ Dendritic Cells for Immune T Cell Areas // *Cell*. – 2010. – T. 143, № 3. – C. 416-429.
59. Turville S. G., Cameron P. U., Handley A., Lin G., Pohlmann S., Doms R. W., Cunningham A. L. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets // *Nature Immunology*. – 2002. – T. 3, № 10. – C. 975-983.

60. Jameson B., Baribaud F., Pohlmann S., Ghavimi D., Mortari F., Doms R. W., Iwasaki A. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques // *Journal of virology*. – 2002. – T. 76, № 4. – C. 1866-1875.
61. Rappocciolo G., Piazza P., Fuller C. L., Reinhart T. A., Watkins S. C., Rowe D. T., Jais M., Gupta P., Rinaldo Jr C. R. DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes // *PLoS pathogens*. – 2006. – T. 2, № 7. – C. e70.
62. Dominguez-Soto A., Sierra-Filardi E., Puig-Kroger A., Perez-Maceda B., Gomez-Aguado F., Corcuera M. T., Sanchez-Mateos P., Cori A. L. Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin Expression on M2-Polarized and Tumor-Associated Macrophages Is Macrophage-CSF Dependent and Enhanced by Tumor-Derived IL-6 and IL-10 // *The Journal of Immunology*. – 2011. – T. 186, № 4. – C. 2192-2200.
63. Geijtenbeek T. B., Torensma R., van Vliet S. J., van Duijnhoven G. C., Adema G. J., van Kooyk Y., Figdor C. G. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses // *Cell*. – 2000. – T. 100. – C. 575-85.
64. Geijtenbeek T. B. H., Krooshoop D. I. J. E. B., Bleijs D. A., van Vliet S. J., van Duijnhoven G. C. F., Grabovsky V., Alon R., Figdor C. G., van Kooyk Y. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking // *Nature immunology*. – 2000. – T. 1, № 4. – C. 353-357.
65. Garcia-Vallejo J. J., van Liempt E., da Costa Martins P., Beckers C., van het Hof B., Gringhuis S. I., Zwaginga J.-J., van Dijk W., Geijtenbeek T. B. H., van Kooyk Y. DC-SIGN mediates adhesion and rolling of dendritic cells on primary human umbilical vein endothelial cells through Lewis-Y antigen expressed on ICAM-2 // *Molecular immunology*. – 2008. – T. 45, № 8. – C. 2359-2369.
66. Shreffler W. G., Castro R. R., Kucuk Z. Y., Charlop-Powers Z., Grishina G., Yoo S., Burks A. W., Sampson H. A. The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro // *The Journal of Immunology*. – 2006. – T. 177, № 6. – C. 3677-3685.
67. Gringhuis S. I., den Dunnen J., Litjens M., van Het Hof B., van Kooyk Y., Geijtenbeek T. B. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB // *Immunity*. – 2007. – T. 26. – C. 605-16.
68. Dominguez-Soto A., Aragonese-Fenoll L., Martin-Gayo E., Martinez-Prats L., Colmenares M., Naranjo-Gomez M., Borrás F. E., Muñoz P., Zubiaur M., Toribio M. L., Delgado R., Corbi A. L. The DC-SIGN-related lectin LSECTin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells // *Blood*. – 2007. – T. 109, № 12. – C. 5337-5345.
69. Powlesland A. S., Ward E. M., Sadhu S. K., Guo Y., Taylor M. E., Drickamer K. Widely divergent biochemical properties of the complete set of mouse DC-SIGN-related proteins // *J Biol Chem*. – 2006. – T. 281. – C. 20440-9.

70. Valladeau J., Ravel O., Dezutter-Dambuyant C., Moore K., Kleijmeer M., Liu Y., Duvert-Frances V. r., Vincent C., Schmitt D., Davoust J., Caux C., Lebecque S., Saeland S. Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules // *Immunity*. – 2000. – T. 12, № 1. – C. 71-81.
71. Pipirou Z., Powlesland A. S., Steffen I., Pohlmann S., Taylor M. E., Drickamer K. Mouse LSECTin as a model for a human Ebola virus receptor // *Glycobiology*. – 2011. – T. 21, № 6. – C. 806-812.
72. Liu W., Tang L., Zhang G., Wei H., Cui Y., Guo L., Gou Z., Chen X., Jiang D., Zhu Y. Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSECTin demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – T. 279, № 18. – C. 18748-18758.
73. Mowry R. W., Millican R. C. A histochemical study of the distribution and fate of dextran in tissues of the mouse // *Am J Pathol*. – 1953. – T. 29. – C. 523-45.
74. Knolle P. A., Germann T., Treichel U., Uhrig A., Schmitt E., Hegenbarth S., Lohse A. W., Gerken G. Endotoxin Down-Regulates T Cell Activation by Antigen-Presenting Liver Sinusoidal Endothelial Cells // *The Journal of Immunology*. – 1999. – T. 162, № 3. – C. 1401-1407.
75. Shu S. A., Lian Z. X., Chuang Y. H., Yang G. X., Moritoki Y., Comstock S. S., Zhong R. Q., Ansari A. A., Liu Y. J., Gershwin M. E. The role of CD11c+ hepatic dendritic cells in the induction of innate immune responses // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2007. – T. 149, № 2. – C. 335-343.
76. Grayson M. H., Chaplin D. D., Karl I. E., Hotchkiss R. S. Confocal fluorescent intravital microscopy of the murine spleen // *Journal of Immunological Methods*. – 2001. – T. 256, № 1-2. – C. 55-63.
77. Mwandumba H. C., Russell D. G., Nyirenda M. H., Anderson J., White S. A., Molyneux M. E., Squire S. B. Mycobacterium tuberculosis Resides in Nonacidified Vacuoles in Endocytically Competent Alveolar Macrophages from Patients with Tuberculosis and HIV Infection // *The Journal of Immunology*. – 2004. – T. 172, № 7. – C. 4592-4598.
78. Caulfield J. P., Farquhar M. G. The Permeability of Glomerular Capillaries to Graded Dextran. Identification of the Basement Membrane as the Primary Filtration Barrier // *The Journal of Cell Biology*. – 1974. – T. 63, № 3. – C. 883-903.
79. Broderick C., Duncan L., Taylor N., Dick A. D. IFN- α and LPS-Mediated IL-10-Dependent Suppression of Retinal Microglial Activation // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2000. – T. 41, № 9. – C. 2613-2622.
80. Groger M., Holnthoner W., Maurer D., Lechleitner S., Wolff K., Mayr B. B., Lubitz W., Petzelbauer P. Dermal microvascular endothelial cells express the 180-kDa macrophage mannose receptor in situ and in vitro // *The Journal of Immunology*. – 2000. – T. 165.

81. Takahashi K., Donovan M. J., Rogers R. A., Ezekowitz R. A. Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood // *Cell Tissue Res.* – 1998. – T. 292. – C. 311-23.
82. Bashirova A. A., Geijtenbeek T. B., van Duijnhoven G. C., van Vliet S. J., Eilering J. B., Martin M. P., Wu L., Martin T. D., Viebig N., Knolle P. A., KewalRamani V. N., van Kooyk Y., Carrington M. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection // *J Exp Med.* – 2001. – T. 193. – C. 671-8.
83. Henze E., Schelbert H. R., Collins J. D., Najafi A., Barrio J. R., Bennett L. R. Lymphoscintigraphy with Tc-99m-labeled dextran // *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine.* – 1982. – T. 23, № 10. – C. 923-929.
84. Padera T. P., Stoll B. R., So P. T., Jain R. K. Conventional and high-speed intravital multiphoton laser scanning microscopy of microvasculature, lymphatics, and leukocyte-endothelial interactions // *Mol Imaging.* – 2002. – T. 1, № 1. – C. 9-15.
85. Ribera J., Pauta M., Melgar-Lesmes P., Tugues S., Fernández-Varo G., Held K. F., Soria G., Tudela R., Planas A. M., Fernández-Hernando C., Arroyo V., Jiménez W., Morales-Ruiz M. Increased nitric oxide production in lymphatic endothelial cells causes impairment of lymphatic drainage in cirrhotic rats // *Gut.* – 2013. – T. 62, № 1. – C. 138-145.
86. Linehan S. The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs // *BMC immunology.* – 2005. – T. 6.
87. Kato M., Neil T. K., Fearnley D. B., McLellan A. D., Vuckovic S., Hart D. N. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells // *Int Immunol.* – 2000. – T. 12. – C. 1511-9.
88. Sadaka C., Marloie-Provost M.-A., Soumelis V., Benaroch P. Developmental regulation of MHC II expression and transport in human plasmacytoid-derived dendritic cells // *Blood.* – 2009. – T. 113, № 10. – C. 2127-2135.
89. Vickery A. L. The Fate of Dextran in Tissues of the Acutely Wounded: A Study of the Histologic Localization of Dextran in Tissues of Korean Battle Casualties* // *The American Journal of Pathology.* – 1956. – T. 32.
90. Kulakov V. N., Pimenova G. N., Matveev V. A., Sedov V. V., Vasil'ev A. E. Pharmacokinetic study of medicinal polymers: Models based on dextrans // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* – 1985. – T. 19. – C. 240-244.
91. Yamaoka T., Tabata Y., Ikada Y. Body distribution profile of polysaccharides after intravenous administration // *Drug Delivery.* – 1993. – T. 1. – C. 75-82.

92. Mehvar R., Robinson M. A., Reynolds J. M. Molecular weight dependent tissue accumulation of dextrans: in vivo studies in rats // *J Pharm Sci.* – 1994. – T. 83. – C. 1495-9.
93. Kaneo Y., Uemura T., Tanaka T., Kanoh S. Polysaccharides as drug carriers: biodisposition of fluorescein-labeled dextrans in mice // *Biol Pharm Bull.* – 1997. – T. 20. – C. 181-7.
94. Tanaka T., Fujishima Y., Hanano S., Kaneo Y. Intracellular disposition of polysaccharides in rat liver parenchymal and nonparenchymal cells // *Int J Pharm.* – 2004. – T. 286, № 1-2. – C. 9-17.
95. Howard J. M., Teng C. T., Loeffler R. K., Johnsen A. Studies of dextrans of various molecular sizes // *Annals of Surgery.* – 1956. – T. 143.
96. Rosenfeld E. L., Lukomskaya I. S. The splitting of dextran and isomaltose by animal tissues // *Clinica chimica acta.* – 1957. – T. 2. – C. 105-114.
97. MacGregor E., Janecek S., Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alfa-amylase family of enzymes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology.* – 2001. – T. 1546. – C. 1-20.
98. Artimo P., Jonnalagedda M., Arnold K., Baratin D., Csardi G., de Castro E., Duvaud S., Flegel V., Fortier A., Gasteiger E., Grosdidier A., Hernandez C., Ioannidis V., Kuznetsov D., Liechti R., Moretti S., Mostaguir K., Redaschi N., Rossier G., Xenarios I., Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal // *Nucleic Acids Research.* – 2012. – T. 40, № W1. – C. W597-W603.
99. Cargill W. H., Bruner H. D. Metabolism of C-14 labeled dextran in the mouse // *J. Pharmacol.* – 1951. – T. 103.
100. Gray I. Metabolism of plasma expanders studied with carbon-14-labeled dextran // *American Journal of Physiology--Legacy Content.* – 1953. – T. 174.
101. Astarie-Dequeker C., N'Diaye E. N., Le Cabec V., Rittig M. G., Prandi J., Maridonneau-Parini I. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages // *Infection and immunity.* – 1999. – T. 67.
102. Schlesinger L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors // *J Immunol.* – 1993. – T. 150, № 7. – C. 2920-30.
103. Kang P. B., Azad A. K., Torrelles J. B., Kaufman T. M., Beharka A., Tibesar E., DesJardin L. E., Schlesinger L. S. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis // *J Exp Med.* – 2005. – T. 202, № 7. – C. 987-99.
104. Nguyen D. G., Hildreth J. E. K. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages // *European journal of immunology.* – 2003. – T. 33. – C. 483-493.

105. Milone M. C., Fitzgerald-Bocarsly P. The Mannose Receptor Mediates Induction of IFN- α in Peripheral Blood Dendritic Cells by Enveloped RNA and DNA Viruses // *The Journal of Immunology*. – 1998. – T. 161, № 5. – C. 2391-2399.
106. Bandivdekar A. H. P1.031 CD4 Independent Binding of HIV to Human Mannose Receptor on Vaginal Epithelial Cells and Sperm // *Sexually Transmitted Infections* – T. 89, № Suppl 1. – C. A83-A83.
107. Crespo H., Reina R., Glaria I., Ramírez H., de Andrés X., Jáuregui P., Luján L., Martínez-Pomares L., Amorena B., de Andrés D. Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection // *Vet Res*. – 2011. – T. 42.
108. Crespo H., Jauregui P., Glaria I., Sanjosé L., Polledo L., García-Marín J. F., Luján L., de Andrés D., Amorena B., Reina R. Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis // *Veterinary research*. – 2012. – T. 43, № 1. – C. 1-6.
109. Newman S. L., Holly A. *Candida albicans* Is Phagocytosed, Killed, and Processed for Antigen Presentation by Human Dendritic Cells // *Infection and immunity*. – 2001. – T. 69, № 11. – C. 6813-6822.
110. Marodi L., Schreiber S., Anderson D. C., MacDermott R. P., Korchak H. M., Johnston R. B. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors // *Journal of Clinical Investigation*. – 1993. – T. 91, № 6. – C. 2596-2601.
111. Reading P. C., Miller J. L., Anders E. M. Involvement of the Mannose Receptor in Infection of Macrophages by Influenza Virus // *Journal of virology*. – 2000. – T. 74, № 11. – C. 5190-5197.
112. Miller J. L., deWet B. J. M., Martinez-Pomares L., Radcliffe C. M., Dwek R. A., Rudd P. M., Gordon S. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages // *PLoS Pathog*. – 2008. – T. 4, № 2.
113. Op den Brouw M. L., Binda R. S., Geijtenbeek T. B. H., Janssen H. L. A., Woltman A. M. The mannose receptor acts as hepatitis B virus surface antigen receptor mediating interaction with intrahepatic dendritic cells // *Virology*. – 2009. – T. 393, № 1. – C. 84-90.
114. Everts B., Hussaarts L., Driessen N. N., Meevissen M. H. J., Schramm G., Ham A. J. v. d., Hoeven B. v. d., Scholzen T., Burgdorf S., Mohrs M., Pearce E. J., Hokke C. H., Haas H., Smits H. H., Yazdanbakhsh M. Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor // *The Journal of experimental medicine*. – 2012. – T. 209, № 10. – C. 1753-1767.
115. Hofmann H., Pohlmann S. DC-SIGN: Access Portal for Sweet Viral Killers // *Cell Host & Microbe*. – 2011. – T. 10, № 1. – C. 5-7.

116. de Witte L., de Vries R. D., van der Vlist M., Ytjksel S., Litjens M., de Swart R. L., Geijtenbeek T. B. H. DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes // *PLoS pathogens*. – 2008. – T. 4, № 4.
117. Schulert G. S., Allen L.-A. H. Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2006. – T. 80, № 3. – C. 563-571.
118. Zhang P., Skurnik M., Zhang S.-S., Schwartz O., Kalyanasundaram R., Bulgheresi S., He J. J., Klena J. D., Hinnebusch B. J., Chen T. Human dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin (CD209) is a receptor for *Yersinia pestis* that promotes phagocytosis by dendritic cells // *Infection and immunity*. – 2008. – T. 76, № 5. – C. 2070-2079.
119. Wilson M. E., Pearson R. D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes // *Infection and immunity*. – 1988. – T. 56, № 2. – C. 363-369.
120. Ueno N., Wilson M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival // *Trends in parasitology*. – 2012. – T. 28, № 8. – C. 335-344.
121. Tailleux L., Schwartz O., Herrmann J. L., Pivert E., Jackson M., Amara A., Legres L., Dreher D., Nicod L. P., Gluckman J. C., Lagrange P. H., Gicquel B., Neyrolles O. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells // *J Exp Med*. – 2003. – T. 197, № 1. – C. 121-7.
122. Geijtenbeek T. B. H., Kwon D. S., Torensma R., van Vliet S. J., van Duijnhoven G. C. F., Middel J., Cornelissen I. L. M. H. A., Nottet H. S. L. M., KewalRamani V. N., Littman D. R., Figdor C. G., van Kooyk Y. DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells // *Cell*. – 2000. – T. 100, № 5. – C. 587-597.
123. Sarkar R., Mitra D., Chakrabarti S. HIV-1 Gp120 Protein Downregulates Nef Induced IL-6 Release in Immature Dendritic Cells through Interplay of DC-SIGN // *PLoS ONE*. – 2013. – T. 8, № 3.
124. Kampani K., Quann K., Ahuja J., Wigdahl B., Khan Z. K., Jain P. A novel high throughput quantum dot-based fluorescence assay for quantitation of virus binding and attachment // *Journal of virological methods*. – 2007. – T. 141, № 2. – C. 125-132.
125. Jain P., Manuel S. L., Khan Z. K., Ahuja J., Quann K., Wigdahl B. DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells // *Journal of virology*. – 2009. – T. 83, № 21. – C. 10908-10921.
126. Cambi A., Gijzen K., de Vries I. J. M., Torensma R., Joosten B., Adema G. J., Netea M. G., Kullberg B.-J., Romani L., Figdor C. G. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells // *European journal of immunology*. – 2003. – T. 33, № 2. – C. 532-538.

127. Londrigan S. L., Tate M. D., Brooks A. G., Reading P. C. Cell-surface receptors on macrophages and dendritic cells for attachment and entry of influenza virus // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2012. – T. 92. – C. 97-106.
128. Hillaire M. L. B., Nieuwkoop N. J., Boon A. C. M., de Mutsert G., Vogelzang-van Trierum S. E., Fouchier R. A. M., Osterhaus A. D. M. E., Rimmelzwaan G. F. Binding of DC-SIGN to the hemagglutinin of influenza A viruses supports virus replication in DC-SIGN expressing cells // . – 2013.
129. Marzi A., Gramberg T., Simmons G., Möller P., Rennekamp A. J., Krumbiegel M., Geier M., Eisemann J., Turza N., Saunier B., Steinkasserer A., Becker S., Bates P., Hofmann H., Pöhlmann S. DC-SIGN and DC-SIGNR Interact with the Glycoprotein of Marburg Virus and the S Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus // *Journal of virology*. – 2004. – T. 78, № 21. – C. 12090-12095.
130. Zhang Y., Buckles E., Whittaker G. R. Expression of the C-type lectins DC-SIGN or L-SIGN alters host cell susceptibility for the avian coronavirus, infectious bronchitis virus // *Veterinary Microbiology*. – 2012. – T. 157, № 3-4. – C. 285-293.
131. Goncalves A.-R., Moraz M.-L., Pasquato A., Helenius A., Lozach P.-Y., Kunz S. Role of DC-SIGN in Lassa Virus Entry into Human Dendritic Cells // *Journal of virology* – T. 87, № 21. – C. 11504-11515.
132. Martinez M. G., Bialecki M. A., Belouzard S., Cordo S. M., Candurra N. I. A., Whittaker G. R. Utilization of human DC-SIGN and L-SIGN for entry and infection of host cells by the New World arenavirus, Junín virus // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2013. – T. 441, № 3. – C. 612-617.
133. Lozach P.-Y., Lortat-Jacob H., Lavalette A. D. L. D., Staropoli I., Fong S., Amara A., Houlès C., Fieschi F., Schwartz O., Virelizier J.-L., Arenzana-Seisdedos F., Altmeyer R. DC-SIGN and L-SIGN Are High Affinity Binding Receptors for Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T. 278, № 22. – C. 20358-20366.
134. Tassaneeritthep B., Burgess T. H., Granelli-Piperno A., Trumpfheller C., Finke J., Sun W., Eller M. A., Pattanapanyasat K., Sarasombath S., Birx D. L., Steinman R. M., Schlesinger S., Marovich M. A. DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells // *The Journal of experimental medicine*. – 2003. – T. 197, № 7. – C. 823-829.
135. Hottz E. D., Oliveira M. F., Nunes P. C. G., Nogueira R. M. R., Valls-de-Souza R., Da Poian A. T., Weyrich A. S., Zimmerman G. A., Bozza P. T., Bozza F. A. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases // *Journal of Thrombosis and Haemostasis* – T. 11, № 5. – C. 951-962.

136. Davis C. W., Nguyen H.-Y., Hanna S. L., Sánchez M. D., Doms R. W., Pierson T. C. West Nile Virus Discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for Cellular Attachment and Infection // *Journal of virology*. – 2006. – T. 80, № 3. – C. 1290-1301.
137. Barkhash A. V., Pereygin A. A., Babenko V. N., Brinton M. A., Voevoda M. I. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis // *Antiviral research*. – 2012. – T. 93, № 1. – C. 64-68.
138. Johnson T. R., McLellan J. S., Graham B. S. Respiratory Syncytial Virus Glycoprotein G Interacts with DC-SIGN and L-SIGN To Activate ERK1 and ERK2 // *Journal of virology*. – 2012. – T. 86, № 3. – C. 1339-1347.
139. Halary F., Amara A., Lortat-Jacob H., Messerle M., Delaunay T., Houlès C., Fieschi F., Arenzana-Seisdedos F., Moreau J.-F. o., Déchanet-Merville J. Human Cytomegalovirus Binding to DC-SIGN Is Required for Dendritic Cell Infection and Target Cell trans-Infection // *Immunity*. – 2002. – T. 17, № 5. – C. 653-664.
140. Rappocciolo G., Jenkins F. J., Hensler H. R., Piazza P., Jais M., Borowski L., Watkins S. C., Rinaldo C. R. DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages // *The Journal of Immunology*. – 2006. – T. 176, № 3. – C. 1741-1749.
141. Rappocciolo G., Hensler H. R., Jais M., Reinhart T. A., Pegu A., Jenkins F. J., Rinaldo C. R. Human herpesvirus 8 infects and replicates in primary cultures of activated B lymphocytes through DC-SIGN // *Journal of virology*. – 2008. – T. 82, № 10. – C. 4793-4806.
142. Alvarez C. P., Lasala F., Carrillo J., Muniz O., Corbi A. L., Delgado R. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans // *J Virol*. – 2002. – T. 76. – C. 6841-4.
143. Appelmelk B. J., van Die I., van Vliet S. J., Vandenbroucke-Grauls C. M., Geijtenbee'k T. B., van Kooyk Y. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells // *J Immunol*. – 2003. – T. 170. – C. 1635-9.
144. Caparros E., Serrano D., Puig-Kroger A., Riol L., Lasala F., Martinez I., Vidal-Vanaclocha F., Delgado R., Rodriguez-Fernandez J., Rivas L., Corbi A., Colmenares M. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in Leishmania interaction with host phagocytes // *Immunobiology*. – 2005. – T. 210, № 2-4. – C. 185-193.
145. Lefevre L., Lugo-Villarino G., Meunier E., Valentin A., Olganier D., Authier H. I., Duval C., Dardenne C., Bernad J., Lemesre J. L. The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to Leishmania infantum // *Immunity*. – 2013. – T. 38, № 5. – C. 1038-1049.

146. Klimstra W. B., Nangle E. M., Smith M. S., Yurochko A. D., Ryman K. D. DC-SIGN and L-SIGN Can Act as Attachment Receptors for Alphaviruses and Distinguish between Mosquito Cell- and Mammalian Cell-Derived Viruses // *Journal of virology*. – 2003. – T. 77, № 22. – C. 12022-12032.
147. Iyori M., Ohtani M., Hasebe A., Totsuka Y., Shibata K.-i. A role of the Ca²⁺ binding site of DC-SIGN in the phagocytosis of *E. coli* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2008. – T. 377, № 2. – C. 367-372.
148. Bloem K., Garcia-Vallejo J. J., Vuist I. M., Cobb B. A., van Vliet S. J., van Kooyk Y. Interaction of the Capsular Polysaccharide A from *Bacteroides fragilis* with DC-SIGN on Human Dendritic Cells is Necessary for Its Processing and Presentation to T Cells // *Frontiers in Immunology*. – 2013. – T. 4.
149. Koppel E. A., Ludwig I. S., Hernandez M. S., Lowary T. L., Gadikota R. R., Tuzikov A. B., Vandenbroucke-Grauls C. M., van Kooyk Y., Appelmelk B. J., Geijtenbeek T. B. Identification of the mycobacterial carbohydrate structure that binds the C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1 // *Immunobiology*. – 2004. – T. 209. – C. 117-27.
150. Taylor P. R., Brown G. D., Herre J., Williams D. L., Willment J. A., Gordon S. The Role of SIGNR1 and the OI-Glucan Receptor (Dectin-1) in the Nonopsonic Recognition of Yeast by Specific Macrophages // *The Journal of Immunology*. – 2004. – T. 172, № 2. – C. 1157-1162.
151. Koppel E. A., Wieland C. W., van den Berg V. C. M., Litjens M., Florquin S., van Kooyk Y., van der Poll T., Geijtenbeek T. B. H. Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection // *European journal of immunology*. – 2005. – T. 35, № 10. – C. 2962-2969.
152. Koppel E. A., Litjens M., van den Berg V. C., van Kooyk Y., Geijtenbeek T. B. H. Interaction of SIGNR1 expressed by marginal zone macrophages with marginal zone B cells is essential to early IgM responses against *Streptococcus pneumoniae* // *Molecular immunology*. – 2008. – T. 45, № 10. – C. 2881-2887.
153. Tanne A., Ma B., Boudou F., Tailleux L., Botella H., Badell E., Levillain F., Taylor M. E., Drickamer K., Nigou J., Dobos K. M., Puzo G., Vestweber D., Wild M. K., Marcinko M., Sobieszczuk P., Stewart L., Lebus D., Gicquel B., Neyrolles O. A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against *Mycobacterium tuberculosis* // *J Exp Med*. – 2009. – T. 206. – C. 2205-20.
154. Pohlmann S., Soilleux E. J., Baribaud F., Leslie G. J., Morris L. S., Trowsdale J., Lee B., Coleman N., Doms R. W. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2001. – T. 98. – C. 2670-5.

155. Gardner J. P., Durso R. J., Arrigale R. R., Donovan G. P., Maddon P. J., Dragic T., Olson W. C. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – T. 100, № 8. – C. 4498-4503.
156. Van Liempt E., Imberty A., Bank C. M., Van Vliet S. J., Van Kooyk Y., Geijtenbeek T. B., Van Die I. Molecular basis of the differences in binding properties of the highly related C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN to Lewis X trisaccharide and *Schistosoma mansoni* egg antigens // *J Biol Chem*. – 2004. – T. 279. – C. 33161-7.
157. Simmons G., Reeves J. D., Grogan C. C., Vandenberghe L. H., Baribaud F. d. r., Whitbeck J. C., Burke E., Buchmeier M. J., Soilleux E. J., Riley J. L., Doms R. W., Bates P., Pöhlmann S. DC-SIGN and DC-SIGNR Bind Ebola Glycoproteins and Enhance Infection of Macrophages and Endothelial Cells // *Virology*. – 2003. – T. 305, № 1. – C. 115-123.
158. Hunger R. E., Sieling P. A., Ochoa M. T., Sugaya M., Burdick A. E., Rea T. H., Brennan P. J., Belisle J. T., Blauvelt A., Porcelli S. A., Modlin R. L. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells // *Journal of Clinical Investigation*. – 2004. – T. 113, № 5. – C. 701-708.
159. de Witte L., Nabatov A., Pion M., Fluitsma D., de Jong M. A. W. P., de Gruijl T., Piguet V., van Kooyk Y., Geijtenbeek T. B. H. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells // *Nature Medicine*. – 2007. – T. 13, № 3. – C. 367-371.
160. de Jong M. A. W. P., Vriend L. E. M., Theelen B., Taylor M. E., Fluitsma D., Boekhout T., Geijtenbeek T. B. H. C-type lectin Langerin is a OI-glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi // *Molecular immunology*. – 2010. – T. 47, № 6. – C. 1216-1225.
161. van der Vlist M., Geijtenbeek T. B. H. Langerin functions as an antiviral receptor on Langerhans cells // *Immunology and Cell Biology*. – 2011. – T. 88, № 4. – C. 410-415.
162. Liu B., Wan'g M., Wan'g X., Zhao D., Liu D., Liu J., Chen P.-J., Yang D., He F., Tang L. Liver Sinusoidal Endothelial Cell Lectin Inhibits CTL-Dependent Virus Clearance in Mouse Models of Viral Hepatitis // *The Journal of Immunology* – T. 190, № 8. – C. 4185-4195.
163. Gramberg T., Hofmann H., Möller P., Lalor P. F., Marzi A., Geier M., Krumbiegel M., Winkler T., Kirchhoff F., Adams D. H., Becker S., Münch J., Pöhlmann S. LSEctin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus // *Virology*. – 2005. – T. 340, № 2. – C. 224-236.
164. Powlesland A. S., Fisch T., Taylor M. E., Smith D. A., Tissot B., Dell A., Pohlmann S., Drickamer K. A Novel Mechanism for LSEctin Binding to Ebola Virus Surface Glycoprotein through Truncated Glycans // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – T. 283, № 1. – C. 593-602.

165. Li Y., Hao B., Kuai X., Xing G., Yang J., Chen J., Tang L., Zhang L., He F. C-type lectin LSECtin interacts with DC-SIGNR and is involved in hepatitis C virus binding // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2009. – T. 327, № 1-2. – C. 183-190.
166. Shimojima M., Ströher U., Ebihara H., Feldmann H., Kawaoka Y. Identification of Cell Surface Molecules Involved in Dystroglycan-Independent Lassa Virus Cell Entry // *Journal of virology*. – 2012. – T. 86, № 4. – C. 2067-2078.
167. Arrighi J.-F. o., Pion M., Wiznerowicz M., Geijtenbeek T. B., Garcia E., Abraham S., Leuba F., Dutoit V. r., Ducrey-Rundquist O., van Kooyk Y. Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells // *Journal of virology*. – 2004. – T. 78, № 20. – C. 10848-10855.
168. Balzarini J., Van Herrewege Y., Vermeire K., Vanham G., Schols D. Carbohydrate-binding agents efficiently prevent dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-directed HIV-1 transmission to T lymphocytes // *Molecular pharmacology*. – 2007. – T. 71, № 1. – C. 3-11.
169. Tran T. H., El Baz R., Cuconati A., Arthos J., Jain P., Khan Z. K. A Novel High-Throughput Screening Assay to Identify Inhibitors of HIV-1 gp120 Protein Interaction with DC-SIGN // *Journal of antivirals & antiretrovirals*. – 2011. – T. 3. – C. 49.
170. Thepaut M., Guzzi C., Sutkeviciute I., Sattin S., Ribeiro-Viana R., Varga N., Chabrol E., Rojo J., Bernardi A., Angulo J., Nieto P. M., Fieschi F. Structure of a Glycomimetic Ligand in the Carbohydrate Recognition Domain of C-type Lectin DC-SIGN. Structural Requirements for Selectivity and Ligand Design // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – T. 135, № 7. – C. 2518-2529.
171. Varga N., Sutkeviciute I., Guzzi C., McGeagh J., Petit-Haertlein I., Gugliotta S., Weiser J. r., Angulo J., Fieschi F., Bernardi A. Selective targeting of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) with mannose-based glycomimetics: synthesis and interaction studies of bis(benzylamide) derivatives of a pseudomannobioside // *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. – 2013. – T. 19, № 15. – C. 4786-4797.
172. Royce R. A., Sena A., Cates Jr W., Cohen M. S. Sexual transmission of HIV // *New England Journal of Medicine*. – 1997. – T. 336, № 15. – C. 1072-1078.
173. Wu L. Biology of HIV mucosal transmission // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2008. – T. 3, № 5. – C. 534.
174. Arrighi J.-F. o., Pion M., Garcia E., van Kooyk Y., Geijtenbeek T. B., Piguet V. DC-SIGN-mediated Infectious Synapse Formation Enhances X4 HIV-1 Transmission from Dendritic Cells to T Cells // *The Journal of experimental medicine*. – 2004. – T. 200, № 10. – C. 1279-1288.

175. Hodges A., Sharrocks K., Edelmann M., Baban D., Moris A., Schwartz O., Drakesmith H., Davies K., Kessler B., McMichael A. Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication // *Nature Immunology*. – 2007. – T. 8, № 6. – C. 569-577.
176. Avota E., Gulbins E., Schneider-Schaulies S. DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells // *PLoS pathogens*. – 2011. – T. 7, № 2. – C. e1001290.
177. Gringhuis S. I., van der Vlist M., van den Berg L. M., den Dunnen J., Litjens M., Geijtenbeek T. B. H. HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells // *Nature Immunology*. – 2010. – T. 11, № 5. – C. 419-426.
178. Este J. A., Telenti A. HIV entry inhibitors // *The Lancet*. – 2007. – T. 370, № 9581. – C. 81-88.
179. Hickman S. P., Chan J., Salgame P. Mycobacterium tuberculosis induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization // *J Immunol*. – 2002. – T. 168, № 9. – C. 4636-42.
180. Van Kooyk Y., Geijtenbeek T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens // *Nat Rev Immunol*. – 2003. – T. 3, № 9. – C. 697-709.
181. Chow A., Toomre D., Garrett W., Mellman I. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane // *Nature*. – 2002. – T. 418, № 6901. – C. 988-94.
182. Tailleux L., Pham-Thi N., Bergeron-Lafaurie A., Herrmann J., Charles P., Schwartz O., Scheinmann P., Lagrange P. H., De Blic J., Tazi A. DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis // *PLoS medicine*. – 2005. – T. 2, № 12. – C. 1269.
183. Relloso M., Puig-Kroger A., Pello O. M., Rodriguez-Fernandez J. L., de la Rosa G., Longo N., Navarro J., Munoz-Fernandez M. A., Sanchez-Mateos P., Corbi A. L. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents // *J Immunol*. – 2002. – T. 168, № 6. – C. 2634-43.
184. Geijtenbeek T. B., van Kooyk Y. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity // *Apmis*. – 2003. – T. 111, № 7-8. – C. 698-714.
185. Patil S. A., Gourie-Devi M., Chaudhuri J. R., Chandramuki A. Identification of antibody responses to Mycobacterium tuberculosis antigens in the CSF of tuberculous meningitis patients by Western blotting // *Clin Immunol Immunopathol*. – 1996. – T. 81, № 1. – C. 35-40.

186. Wallis R. S., Pai M., Menzies D., Doherty T. M., Walzl G., Perkins M. D., Zumla A. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice // *Lancet*. – 2010. – T. 375, № 9729. – C. 1920-37.
187. Pitarque S., Herrmann J. L., Duteyrat J. L., Jackson M., Stewart G. R., Lecointe F., Payre B., Schwartz O., Young D. B., Marchal G., Lagrange P. H., Puzo G., Gicquel B., Nigou J., Neyrolles O. Deciphering the molecular bases of *Mycobacterium tuberculosis* binding to the lectin DC-SIGN reveals an underestimated complexity // *Biochem J*. – 2005. – T. 392, № Pt 3. – C. 615-24.
188. Driessen N. N., Ummels R., Maaskant J. J., Gurcha S. S., Besra G. S., Ainge G. D., Larsen D. S., Painter G. F., Vandenbroucke-Grauls C. M., Geurtsen J., Appelmelk B. J. Role of phosphatidylinositol mannosides in the interaction between mycobacteria and DC-SIGN // *Infect Immun*. – 2009. – T. 77, № 10. – C. 4538-47.
189. Ehlers S. DC-SIGN and mannosylated surface structures of *Mycobacterium tuberculosis*: a deceptive liaison // *Eur J Cell Biol*. – 2010. – T. 89, № 1. – C. 95-101.
190. Vannberg F. O., Chapman S. J., Khor C. C., Tosh K., Floyd S., Jackson-Sillah D., Crampin A., Sichali L., Bah B., Gustafson P., Aaby P., McAdam K. P., Bah-Sow O., Lienhardt C., Sirugo G., Fine P., Hill A. V. CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease // *PLoS ONE*. – 2008. – T. 3, № 1. – C. e1388.
191. Ben-Ali M., Barreiro L. B., Chabbou A., Haltiti R., Braham E., Neyrolles O., Dellagi K., Gicquel B., Quintana-Murci L., Barbouche M. R. Promoter and neck region length variation of DC-SIGN is not associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients // *Hum Immunol*. – 2007. – T. 68, № 11. – C. 908-12.
192. Olesen R., Wejse C., Velez D. R., Bisseye C., Sodemann M., Aaby P., Rabna P., Worwui A., Chapman H., Diatta M., Adegbola R. A., Hill P. C., Ostergaard L., Williams S. M., Sirugo G. DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans // *Genes Immun*. – 2007. – T. 8, № 6. – C. 456-67.
193. Barreiro L. B., Neyrolles O., Babb C. L., Tailleux L., Quach H., McElreavey K., Helden P. D., Hoal E. G., Gicquel B., Quintana-Murci L. Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis // *PLoS Med*. – 2006. – T. 3, № 2. – C. e20.
194. Kahnert A., Seiler P., Stein M., Bandermann S., Hahnke K., Mollenkopf H., Kaufmann S. H. Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis* // *Eur J Immunol*. – 2006. – T. 36, № 3. – C. 631-47.
195. Granelli-Piperno A., Pritsker A., Pack M., Shimeliovich I., Arrighi J. F., Park C. G., Trumpfheller C., Piguet V., Moran T. M., Steinman R. M. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not

- required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction // *J Immunol.* – 2005. – T. 175, № 7. – C. 4265-73.
196. Teles R. M., Krutzik S. R., Ochoa M. T., Oliveira R. B., Sarno E. N., Modlin R. L. IL-4 regulates the expression of CD209 and subsequent uptake of *Mycobacterium leprae* by Schwann cells in human leprosy // *Infect Immun.* – 2010.
197. Maggi E., Parronchi P., Manetti R., Simonelli C., Piccinni M. P., Rugiu F. S., De Carli M., Ricci M., Romagnani S. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones // *J Immunol.* – 1992. – T. 148, № 7. – C. 2142-7.
198. Rook G. A., Hernandez-Pando R., Dheda K., Teng Seah G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design // *Trends Immunol.* – 2004. – T. 25, № 9. – C. 483-8.
199. den Dunnen J., Gringhuis S. I., Geijtenbeek T. B. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses // *Cancer Immunol Immunother.* – 2009. – T. 58, № 7. – C. 1149-57.
200. Ohtani M., Hasebe A., Iyori M., Mohammad H. S., Totsuka Y., Shibata K.-i. Downregulation of the TLR2-mediated signal by the DC-SIGN ligand Man-LAM // *The Journal of Immunology.* – 2009. – T. 182, № Meeting Abstracts 1. – C. 135.14.
201. Rajaram M. V., Brooks M. N., Morris J. D., Torrelles J. B., Azad A. K., Schlesinger L. S. *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses // *J Immunol.* – 2010. – T. 185, № 2. – C. 929-42.
202. Ilangumaran S., Arni S., Poincelet M., Theler J. M., Brennan P. J., Nasir ud D., Hoessli D. C. Integration of mycobacterial lipoarabinomannans into glycosylphosphatidylinositol-rich domains of lymphomonocytic cell plasma membranes // *J Immunol.* – 1995. – T. 155, № 3. – C. 1334-42.
203. Bernardo J., Billingslea A. M., Blumenthal R. L., Seetoo K. F., Simons E. R., Fenton M. J. Differential responses of human mononuclear phagocytes to mycobacterial lipoarabinomannans: role of CD14 and the mannose receptor // *Infect Immun.* – 1998. – T. 66, № 1. – C. 28-35.
204. Malik Z. A., Denning G. M., Kusner D. J. Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages // *J Exp Med.* – 2000. – T. 191, № 2. – C. 287-302.
205. Rivera-Marrero C. A., Schuyler W., Roser S., Ritzenthaler J. D., Newburn S. A., Roman J. M. tuberculosis induction of matrix metalloproteinase-9: the role of mannose and receptor-mediated mechanisms // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2002. – T. 282, № 3. – C. L546-55.
206. Schlesinger L. S., Kaufman T. M., Iyer S., Hull S. R., Marchiando L. K. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages // *J Immunol.* – 1996. – T. 157, № 10. – C. 4568-75.

207. Rajaram M., Ni B., Carlson T., Schlesinger L. Mannose receptor (CD206)-mediated signaling in human macrophages in the context of tuberculosis (INC7P. 418) // *The Journal of Immunology*. – 2014. – Т. 192, № 1 Supplement. – С. 186.19-186.19.
208. Rajaram M., Ni B., Arnett E., Abul A., Schlesinger L. FcROi-chain, Grb2 and SHP-1 are involved in mannose receptor (CD206)-mediated signaling in relation to tuberculosis (INC4P. 329) // *The Journal of Immunology*. – 2015. – Т. 194, № 1 Supplement. – С. 125.8-125.8.
209. Hart P. A. Mycobacterium tuberculosis in macrophages: effect of certain surfactants and other membrane-active compounds // *Science*. – 1968. – Т. 162, № 3854. – С. 686-689.
210. Fodor T., Kertay N. [Effect of dextran on experimental tuberculosis in guinea pigs.] // *Tuberkulozis*. – 1961. – Т. 14. – С. 171-172.
211. Fodor T., Kertay N. [Effect of dextran on experimental tuberculosis in rabbits.] // *Tuberkulozis*. – 1962. – Т. 15. – С. 67-69.
212. Shkurupy V. A., Kurunov J. N., Arkhipov S. A. [Antibacterial efficiency of prolonged isoniazid formulation in experiment] [In Russian] // *Problemy tuberkuleza*. – 1997. № 2. – С. 54-56.
213. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. / Шкурупий В. А.: М.: Издательство РАМН, 2007. – 536 с.
214. Elkington P. T., D'Armiento J. M., Friedland J. S. Tuberculosis immunopathology: the neglected role of extracellular matrix destruction // *Science translational medicine*. – 2011. – Т. 3, № 71. – С. 71ps6-71ps6.
215. Dartois V. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells // *Nature Reviews Microbiology*. – 2014. – Т. 12, № 3. – С. 159-167.
216. Shkurupy V. A., Selyatitskaya V. G., Tsyrendorzhiev D. D., Pal'chikova N. A., Kurilin V. V., Travin M. A., Nadeev A. P., Troitskii A. V. Effects of modified amphotericin in experimental systemic candidiasis // *Bull Exp Biol Med*. – 2007. – Т. 143. – С. 392-4.
217. Полякова И. Н., Гинак А. И., Москвичев Б. В., Шитикова Г. С. Химическая модификация ремантадина с помощью полисахаридов и свойства полученного продукта // *Известия волгоградского государственного технического университета*. – 2011. – Т. 8, № 2.
218. Потапова О. В., Шкурупий В. А. Влияние диальдегиддекстрана на структурные изменения в печени и легких при хроническом БЦЖ-гранулематозе // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2008. № Прил. 1. – С. 113-115.
219. Потапова О. В., Шкурупий В. А., Шаркова Т. В., Троицкий А. В., Лузгина Н. Г., Шестопалов А. М. Исследование профилактической эффективности окисленного декстрана и патоморфологических процессов в легких мышей при гриппе птиц А/Н5N1 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2010. – Т. 12. – С. 650-653.

220. Lee B., Clemens D. L., Horwitz M. A. The metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*, assessed by use of a novel inducible GFP expression system, correlates with its capacity to inhibit phagosomal maturation and acidification in human macrophages // *Molecular microbiology*. – 2008. – T. 68, № 4. – C. 1047-1060.
221. Mantegazza A. R., Savina A., Vermeulen M., Pérez L., Geffner J., Hermine O., Rosenzweig S. D., Faure F., Amigorena S. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells // *Blood*. – 2008. – T. 112, № 12. – C. 4712-4722.
222. Pustylnikov S. Dextran as Ligands of Mannose Receptor and DC-SIGN Family Receptors - A Novel Means of Modulating Th1/Th2 Immune Responses (Abstract Book) // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. – 2012. – T. 109. – C. A108,-P248.
223. Pustylnikov S., DuBuske L. Inhibiting the binding of allergens having glycosylated structures by dextrans as a potential immunomodulatory strategy // *European Academy of Allergy and Clinical Immunology and World Allergy Organization Congress, Milan, Italy, June 22-26, 2013* –, 2013. – C. 885.
224. Peng X., Sova P., Green R. R., Thomas M. J., Korth M. J., Prohl S., Xu J., Cheng Y., Yi K., Chen L. Deep sequencing of HIV-infected cells: insights into nascent transcription and host-directed therapy // *Journal of virology*. – 2014. – T. 88, № 16. – C. 8768-8782.
225. Wallis R. S., Hafner R. Advancing host-directed therapy for tuberculosis // *Nature Reviews Immunology*. – 2015. – T. 15, № 4. – C. 255-263.
226. Keler T., Ramakrishna V., Fanger M. W. Mannose receptor-targeted vaccines // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2004. – T. 4, № 12. – C. 1953-1962.
227. Gao J., Chen P., Singh Y., Zh. X., Szekely Z., Stein S., Sinko P. J. Novel Monodisperse PEGtide Dendrons: Design, Fabrication, and Evaluation of Mannose Receptor-Mediated Macrophage Targeting // *Bioconjugate Chemistry* – T. 24, № 8. – C. 1332-1344.
228. Mehvar R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents // *J Control Release*. – 2000. – T. 69. – C. 1-25.
229. Tacke P. J., ter Huurne M., Torensma R., Figdor C. G. Antibodies and carbohydrate ligands binding to DC-SIGN differentially modulate receptor trafficking // *European journal of immunology*. – 2012. – T. 42, № 8. – C. 1989-1998.
230. Hesse C., Ginter W., Förg T., Mayer C. T., Baru A. M., Arnold-Schrauf C., Unger W. W. J., Kalay H., van Kooyk Y., Berod L., Sparwasser T. In vivo targeting of human DC-SIGN drastically enhances CD8+T-cell-mediated protective immunity // *European journal of immunology*. – 2013. – C. n/a-n/a.

231. Anderluh M., Chang C.-F. DC-SIGN Antagonists - A Paradigm of C-Type Lectin Binding Inhibition // *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*InTech, 2012.
232. Tabarani G., Thepaut M., Stroebel D., Ebel C., Vivitès C., Vachette P., Durand D., Fieschi F. DC-SIGN neck domain is a pH-sensor controlling oligomerization SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – T. 284, № 32. – C. 21229-21240.
233. Connor R. I., Chen B. K., Choe S., Landau N. R. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes // *Virology*. – 1995. – T. 206, № 2. – C. 935-944.
234. Wu L., Martin T. D., Carrington M., KewalRamani V. N. Raji B cells, misidentified as THP-1 cells, stimulate DC-SIGN-mediated HIV transmission // *Virology*. – 2004. – T. 318, № 1. – C. 17-23.
235. Zuckerman S. H., Ackerman S. K., Douglas S. D. Long-term human peripheral blood monocyte cultures: establishment, metabolism and morphology of primary human monocyte-macrophage cell cultures // *Immunology*. – 1979. – T. 38, № 2. – C. 401.
236. Bonecini-Almeida M. G., Chitale S., Boutsikakis I., Geng J., Doo H., He S., Ho J. L. Induction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN- γ and primed lymphocytes // *The Journal of Immunology*. – 1998. – T. 160, № 9. – C. 4490-4499.
237. Bol S. M., van Remmerden Y., Sietzema J. G., Kootstra N. A., Schuitemaker H., van't Wout A. I. B. Donor variation in in vitro HIV-1 susceptibility of monocyte-derived macrophages // *Virology*. – 2009. – T. 390, № 2. – C. 205-211.
238. Tabarani G., Reina J. J., Ebel C., Vivitès C., Lortat-Jacob H., Rojo J., Fieschi F. Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding // *FEBS letters*. – 2006. – T. 580, № 10. – C. 2402-2408.
239. Rangel Moreno J., Estrada García I., De La Luz García Hernández M., Aguilar Leon D., Marquez R., Hernández Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis // *Immunology*. – 2002. – T. 106, № 2. – C. 257-266.
240. Copenhaver R. H., Sepulveda E., Armitage L. Y., Actor J. K., Wanger A., Norris S. J., Hunter R. L., Jagannath C. A mutant of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv that lacks expression of antigen 85A is attenuated in mice but retains vaccinogenic potential // *Infection and immunity*. – 2004. – T. 72, № 12. – C. 7084-7095.
241. Dong C., Janas A. M., Wang J.-H., Olson W. J., Wu L. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection // *Journal of virology*. – 2007. – T. 81, № 20. – C. 11352-11362.
242. Rahman S., Manuel S. L., Khan Z. K., Wigdahl B., Acheampong E., Tangy F., Jain P. Depletion of dendritic cells enhances susceptibility to cell-free infection of human T cell leukemia virus type 1 in

- CD11c-diphtheria toxin receptor transgenic mice // *The Journal of Immunology*. – 2010. – T. 184, № 10. – C. 5553-5561.
243. Gagliardi M. C., Teloni R., Giannoni F., Pardini M., Sargentini V., Brunori L., Fattorini L., Nisini R. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN-dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production // *Journal of leukocyte biology*. – 2005. – T. 78, № 1. – C. 106-113.
244. Overbergh L., Giulietti A., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression // *Journal of biomolecular techniques: JBT*. – 2003. – T. 14, № 1. – C. 33.
245. Bibova I., Linhartova I., Stanek O., Rusnakova V., Kubista M., Suchanek M., Vasakova M., Sebo P. Detection of immune cell response to *M. tuberculosis*-specific antigens by quantitative polymerase chain reaction // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2012. – T. 72, № 1. – C. 68-78.
246. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic acids research*. – 2001. – T. 29, № 9. – C. e45-e45.
247. Robinson C. M., Nau G. J. Interleukin-12 and interleukin-27 regulate macrophage control of *Mycobacterium tuberculosis* // *Journal of Infectious Diseases*. – 2008. – T. 198, № 3. – C. 359-366.
248. Volpe E., Cappelli G., Grassi M., Martino A., Serafino A., Colizzi V., Sanarico N., Mariani F. Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with *Mycobacterium tuberculosis* // *Immunology*. – 2006. – T. 118, № 4. – C. 449-460.
249. Gonnord P., Blouin C. d. M., Lamaze C. Membrane trafficking and signaling: two sides of the same coin // *Seminars in cell & developmental biology*. – T. 23 –Elsevier, 2012. – C. 154-164.
250. Matsumoto H., Suzuki K., Tsuyuguchi K., Tanaka E., Amitani R., Maeda A., Yamamoto K., Sasada M., Kuze F. Interleukin-12 gene expression in human monocyte-derived macrophages stimulated with *Mycobacterium bovis* BCG: cytokine regulation and effect of NK cells // *Infection and immunity*. – 1997. – T. 65, № 11. – C. 4405-4410.
251. Siliciano R. F. Opening fronts in HIV vaccine development: Targeting reservoirs to clear and cure // *Nature Medicine*. – 2014. – T. 20, № 5. – C. 480-481.
252. Champion E. W., Getahun H., Matteelli A., Chaisson R. E., Raviglione M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – T. 372, № 22. – C. 2127-2135.
253. Wong A. The HIV pipeline // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2014. – T. 13, № 9. – C. 649-650.
254. Drickamer K., Taylor M. E. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system // *Current opinion in structural biology*. – 2015. – T. 34. – C. 26-34.
255. Iborra S., Sancho D. Signalling versatility following self and non-self sensing by myeloid C-type lectin receptors // *Immunobiology*. – 2015. – T. 220, № 2. – C. 175-184.

256. Garcia-Vallejo J. J., Bloem K., Knippels L. o. M. J., Garssen J., van Vliet S. J., van Kooyk Y. The consequences of multiple simultaneous C-type lectin-ligand interactions: DCIR alters the endo-lysosomal routing of DC-SIGN // *Frontiers in immunology*. – 2015. – T. 6.
257. Aretz J., Wamhoff E.-C., Hanske J., Heymann D., Rademacher C. Computational and experimental prediction of human C-type lectin receptor druggability // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – T. 5.
258. Varga N., Sutkeviciute I., Ribeiro-Viana R., Berzi A., Ramdasi R., Daggetti A., Vettoretti G., Amara A., Clerici M., Rojo J. A multivalent inhibitor of the DC-SIGN dependent uptake of HIV-1 and Dengue virus // *Biomaterials*. – 2014. – T. 35, № 13. – C. 4175-4184.
259. Clapham P. R., McKnight A. HIV-1 receptors and cell tropism // *British medical bulletin*. – 2001. – T. 58, № 1. – C. 43-59.
260. Pino M., Erkizia I., Benet S., Erikson E., Fernandez-Figueras M. T., Guerrero D., Dalmau J., Ouchi D., Rausell A., Ciuffi A. HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells // *Retrovirology*. – 2015. – T. 12, № 1. – C. 37.
261. Kijewski S. D. G., Gummuluru S. A mechanistic overview of dendritic cell-mediated HIV-1 trans infection: the story so far // *Future Virology*. – 2015. – T. 10, № 3. – C. 257-269.
262. Izquierdo-Useros N., Lorizate M., McLaren P. J., Telenti A., Krausslich H.-G., Martinez-Picado J. HIV-1 capture and transmission by dendritic cells: the role of viral glycolipids and the cellular receptor Siglec-1 // . – 2014.
263. Boily-Larouche G., Milev M. P., Zijenah L. S., Labbe A.-C., Zannou D. M., Humphrey J. H., Ward B. J., Poudrier J., Mouland A. J., Cohen Γ. r. A. Naturally-occurring genetic variants in human DC-SIGN increase HIV-1 capture, cell-transfer and risk of mother-to-child transmission // *PLoS ONE*. – 2012. – T. 7, № 7. – C. e40706.
264. Sharova N., Swingler C., Sharkey M., Stevenson M. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans // *The EMBO journal*. – 2005. – T. 24, № 13. – C. 2481-2489.
265. Cassol E., Cassetta L., Rizzi C., Gabuzda D., Alfano M., Poli G. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin mediates HIV-1 infection of and transmission by M2a-polarized macrophages in vitro // *AIDS*. – 2013. – T. 27, № 5. – C. 707-716.
266. Preza G. C., Tanner K., Elliott J., Yang O. O., Anton P. A., Ochoa M.-T. Antigen-presenting cell candidates for HIV-1 transmission in human distal colonic mucosa defined by CD207 dendritic cells and CD209 macrophages // *AIDS research and human retroviruses*. – 2014. – T. 30, № 3. – C. 241-249.
267. Larsson B., Lalos O., Marsk L., Tronstad S. E., Bygdeman M., Pehrson S., Joelsson I. Effect of intraperitoneal instillation of 32% dextran 70 on postoperative adhesion formation after tubal surgery // *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. – 1985. – T. 64, № 5. – C. 437-441.

268. Пустыльников С. В. Исследование цитотоксического действия декстранов, окисленных солями Mn[VII] // *Фундаментальные науки и практика* – Томск, 2010. –
269. Kaneko T., Kohmoto T., Fukui F., Akiba T., Suzuki S., Hirao A., Nakatsuru S., Kanisawa M. Acute and chronic toxicity and mutagenicity studies on isomaltooligosaccharides, and the effects on peripheral blood lymphocytes and intestinal microflora // *Shokuhin Eiseigaku Zasshi= Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. – 1990. – Т. 31, № 5. – С. 394-403.
270. Burleigh L., Lozach P.-Y., Schiffer C. c., Staropoli I., Pezo V. r., Porrot F. o., Canque B., Virelizier J.-L., Arenzana-Seisdedos F., Amara A. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells // *Journal of virology*. – 2006. – Т. 80, № 6. – С. 2949-2957.
271. Miyauchi K., Kim Y., Latinovic O., Morozov V., Melikyan G. B. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes // *Cell*. – 2009. – Т. 137, № 3. – С. 433-444.
272. Mohammadi P., Desfarges S., Bartha I., Joos B., Zangger N., Munoz M., Gunthard H. F., Beerenwinkel N., Telenti A., Ciuffi A. 24 hours in the life of HIV-1 in a T cell line // *PLoS Pathog.* – 2015. – Т. 9, № 1. – С. e1003161.
273. Sol-Foulon N., Moris A., Nobile C., Boccaccio C., Engering A., Abastado J.-P., Heard J.-M., Van Kooyk Y., Schwartz O. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread // *Immunity*. – 2002. – Т. 16, № 1. – С. 145-155.
274. Maravillas-Montero J. L., Lopez-Ortega O., Patino-Lopez G., Santos-Argumedo L. Myosin 1g regulates cytoskeleton plasticity, cell migration, exocytosis, and endocytosis in B lymphocytes // *European journal of immunology*. – 2014. – Т. 44, № 3. – С. 877-886.
275. Loomis R. J., Holmes D. A., Elms A., Solski P. A., Der C. J., Su L. Citron Kinase, a RhoA Effector, Enhances HIV-1 Virion Production by Modulating Exocytosis // *Traffic*. – 2006. – Т. 7, № 12. – С. 1643-1653.
276. Wiley R. D., Gummuluru S. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Т. 103, № 3. – С. 738-743.
277. Moris A., Nobile C., Buseyne F., Porrot F. o., Abastado J.-P., Schwartz O. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation // *Blood*. – 2004. – Т. 103, № 7. – С. 2648-2654.
278. Fredericksen B. L., Wei B. L., Yao J., Luo T., Garcia J. V. Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus // *Journal of virology*. – 2002. – Т. 76, № 22. – С. 11440-11446.

279. Rink J., Ghigo E., Kalaidzidis Y., Zerial M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes // *Cell*. – 2005. – T. 122, № 5. – C. 735-749.
280. Turville S. G., Santos J. J., Frank I., Cameron P. U., Wilkinson J., Miranda-Saksena M., Dable J., Stülgen H., Romani N., Piatak M. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells // *Blood*. – 2004. – T. 103, № 6. – C. 2170-2179.
281. Feinberg H., Mitchell D. A., Drickamer K., Weis W. I. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR // *Science*. – 2001. – T. 294, № 5549. – C. 2163-2166.
282. Alexandre K. B., Gray E. S., Mufhandu H., McMahon J. B., Chakauya E., O'Keefe B. R., Chikwamba R., Morris L. The lectins griffithsin, cyanovirin-N and scytovirin inhibit HIV-1 binding to the DC-SIGN receptor and transfer to CD4+ cells // *Virology*. – 2012. – T. 423, № 2. – C. 175-186.
283. Ordanini S., Varga N., Porkolab V., Thepaut M., Belvisi L., Bertaglia A., Palmioli A., Berzi A., Trabattoni D., Clerici M. Designing nanomolar antagonists of DC-SIGN-mediated HIV infection: ligand presentation using molecular rods // *Chemical Communications*. – 2015. – T. 51, № 18. – C. 3816-3819.
284. Berzi A., Varga N., Antonazzo P., Cetin I., Biasin M., Trabattoni D., Bernardi A., Clerici M. Pseudo-mannosylated compounds inhibit DC-SIGN mediated HIV infection by competitive inhibition and by interfering with DC-SIGN signal // *Frontiers in Immunology*. – 2013. – C. 168.
285. Garcia-Vallejo J. J., Koning N., Ambrosini M., Kalay H., Vuist I., Sarrami-Forooshani R., Geijtenbeek T. B. H., van Kooyk Y. Glycodendrimers prevent HIV transmission via DC-SIGN on dendritic cells // *International immunology*. – 2013. – C. dxs115.
286. Veazey R. S., Klasse P. J., Schader S. M., Hu Q., Ketas T. J., Lu M., Marx P. A., Dufour J., Colonno R. J., Shattock R. J. Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by vaginally delivered inhibitors of virus-cell fusion // *Nature*. – 2005. – T. 438, № 7064. – C. 99-102.
287. Srivastava S., Ernst J. D., Desvignes L. Beyond macrophages: the diversity of mononuclear cells in tuberculosis // *Immunological reviews*. – 2014. – T. 262, № 1. – C. 179-192.
288. Eum S.-Y., Kong J.-H., Hong M.-S., Lee Y.-J., Kim J.-H., Hwang S.-H., Cho S.-N., Via L. E., Barry C. E. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB // *CHEST Journal*. – 2010. – T. 137, № 1. – C. 122-128.
289. Flynn J. L., Chan J., Lin P. L. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis // *Mucosal immunology*. – 2011. – T. 4, № 3. – C. 271-278.
290. Hmama Z., Pena-Diaz S., Joseph S., Av-Gay Y. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis* // *Immunological reviews*. – 2014. – T. 264, № 1. – C. 220-232.

291. Martinez F. O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment // *F1000prime reports*. – 2014. – T. 6.
292. Jeyanathan M., McCormick S., Lai R., Afkhami S., Shaler C. R., Horvath C. N., Damjanovic D., Zganiacz A., Barra N., Ashkar A. Pulmonary M. tuberculosis infection delays Th1 immunity via immunoadaptor DAP12-regulated IRAK-M and IL-10 expression in antigen-presenting cells // *Mucosal immunology*. – 2014. – T. 7, № 3. – C. 670-683.
293. Barbarin V., Xing Z., Delos M., Lison D., Huaux F. Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2005. – T. 288, № 5. – C. L841-L848.
294. Puig-Kröger A., Serrano-Gómez D., Caparrós E., Domínguez-Soto A., Relloso M., Colmenares M., Martínez-Muñoz L., Longo N., Sillero-Schue J., Sánchez-Sánchez N., Rincon M. Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – T. 279, № 24. – C. 25680-25688.
295. Mustafa A. S. T-helper 1, T-helper 2, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis // *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*. – 2014. – T. 3, № 4. – C. 1.
296. Nigou J. r., Zelle-Rieser C., Gilleron M., Thurnher M., Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor // *The Journal of Immunology*. – 2001. – T. 166, № 12. – C. 7477-7485.
297. Blischak J. D., Tailleux L., Mitrano A., Barreiro L. B., Gilad Y. Mycobacterial infection induces a specific human innate immune response // *Scientific reports*. – 2015. – T. 5.
298. Hernández-Pando R., Orozco-Esteves H., Maldonado H. A., Aguilar-Leon D., Vilchis-Landeros M. M., Mata-Espinosa D. A., Mendoza V., Lopez-Casillas F. A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2006. – T. 144, № 2. – C. 264-272.
299. Toossi Z., Ellner J. J. The role of TGFOI in the pathogenesis of human tuberculosis // *Clinical immunology and immunopathology*. – 1998. – T. 87, № 2. – C. 107-114.
300. Seiscento M., Vargas F. S., Antonangelo L., Acencio M. M. P., Bombarda S., Capelozzi V. L., Teixeira L. R. Transforming growth factor β -1 as a predictor of fibrosis in tuberculous pleurisy // *Respirology*. – 2007. – T. 12, № 5. – C. 660-663.
301. Shkurupy V. A., Kozyaev M. A., Potapov'a O. V. Morphological Study of the Efficiency of Isoniazid and Dialdehyde Dextran Composition in the Treatment of Mice with BCG Granulomatosis // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2008. – T. 146. – C. 853-856.

302. Xu X.-L., Zhang P., Shen Y.-H., Li H.-Q., Wang Y.-H., Lu G.-H., Zhou J.-Y. Mannose prevents acute lung injury through mannose receptor pathway and contributes to regulate PPAR α and TGF- β 1 level // *International journal of clinical and experimental pathology*. – 2015. – T. 8, № 6. – C. 6214.
303. Gorak-Stolinska P., Weir R. E., Floyd S., Lalor M. K., Stenson S., Branson K., Blitz R., Luke S., Nazareth B., Ben-Smith A. Immunogenicity of Danish-SSI 1331 BCG vaccine in the UK: comparison with Glaxo-Evans 1077 BCG vaccine // *Vaccine*. – 2006. – T. 24, № 29. – C. 5726-5733.