

Н.К. Ахматова ¹, О.В. Лебединская ², М.Б. Бродовский ², Э.А. Ахматов ¹, Е.А. Лебединская ²,
Е.А. Ильиных ², Е.А. Курбатова ¹

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКАХ МЫШЕЙ ПРИ МУКОЗАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ АНТИГЕНАМИ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

¹ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН (Москва)

² Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера (Пермь)

Важным показателем действия иммуотропных препаратов является их влияние на продукцию цитокинов, осуществляющих взаимодействие между эффекторами как врожденного, так и адаптивного иммунитета. В работе определялся уровень цитокинов при мукозальных методах иммунизации вакциной Иммуновак-ВП-4 в сравнении с подкожным введением этого же препарата. При интраназальном и пероральном методах аппликации антигенов повышалась экспрессия IL-5, IL-6, IL-12, при подкожном – IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-12, IFN γ . Выявленный цитокиновый профиль мышей подтвердил, что независимо от метода введения препарата Иммуновак происходит активация эффекторов иммунной системы, о чем свидетельствует повышение уровня провоспалительных и регуляторных цитокинов. Сделан вывод, что введение антигенов условно патогенных микроорганизмов инициирует активацию целого каскада иммунологических реакций, и под воздействием синтезированных цитокинов происходит поляризация иммунного ответа преимущественно по Th1 типу.

Ключевые слова: цитокины, Иммуновак ВП-4, мукозальные методы иммунизации

MICE SERUM CYTOKINE LEVEL UNDER MUCOSAL IMMUNIZATION WITH OPPORTUNISTIC MICROBIAL ANTIGENS

Н.К. Akhmatova ¹, O.V. Lebedinskaya ², M.B. Brodovsky ², E.A. Akhmatov ¹,
E.A. Lebedinskaya ², E.A. Ilinykh ², E.A. Kurbatova ¹

¹ I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera RAMS, Moscow

² E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm

An important parameter of immunotropic preparation effect is the influence on the production of cytokines that provide the interaction between the effectors of both congenital and adaptive immunity. Cytokine level was determined in the work while using the methods of mucosal immunization with Immunovac-VP-4 and compared with the subcutaneous introduction of this preparation. In case of intranasal and peroral methods of antigen application IL-5, IL-6, and IL-12 expression was found to be elevated, the same was true for IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-12, and IFN γ under the subcutaneous immunization. Resulting mice cytokine profile confirmed that irrespective of the method of Immunovac introduction, the activation of immune effectors occurred that was manifested in the increase in proinflammatory and regulatory cytokine levels. It was concluded that the introduction of opportunistic microbial antigens initiated the activation of the cascade of immunologic reactions and under the influence of synthesized cytokines the polarization of immune response was involved that was predominantly of Th1 type.

Key words: cytokines, Immunovac VP-4, mucosal methods of immunization

Иммунная система слизистых оболочек служит первым и наиболее значимым барьером для развития вирусных и бактериальных инфекций. Именно поэтому проблема мукозальной иммунизации является одним из приоритетных направлений современной иммунологии [2]. В настоящее время изучение механизмов регуляции иммунного ответа слизистых оболочек находится на начальной стадии, что обусловлено технологическими трудностями конструирования мукозальных вакцин и недостаточностью данных по характеристике создаваемого иммунитета, связанной со сложностью организации мукозальной иммунной системы [5].

Важным показателем действия иммуотропных препаратов является их влияние на продукцию цитокинов, осуществляющих взаимодействие между эффекторами как врожденного, так и адаптивного иммунитета. В наших исследованиях был изучен уровень цитокинов при мукозальных методах иммунизации вакциной Иммуновак-ВП-4 в

сравнении с подкожным введением этого же препарата. Определялось содержание цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, IL-12, IL-5, TNF α и IFN γ в сыворотке крови интактных и вакцинированных мышей через 24 часа после введения Иммуновак-ВП-4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты

Поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4® (ФГУП «НПО «Микроген») из антигенов условно патогенных микроорганизмов (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) предназначена для иммунотерапии хронических воспалительных и аллергических заболеваний. Вакцина содержит липополисахариды (ЛПС), ассоциированные с белком наружной мембраны грамотрицательных микроорганизмов, пептидогликан, тейхоевые кислоты и липопротеины, являющиеся лигандами для Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors – TLRs).

Экспериментальные животные

Использовались мыши линий СВА с массой тела 16 – 18 г, полученные из питомника НЦ Биомедицинских технологий РАМН «Андреевка» и содержащиеся в условиях вивария НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Определение уровня цитокинов

Цитокины в сыворотках крови мышей определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем фирмы Bender MedSystems (США) согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Excel (Microsoft Corporation, США), интегрированным пакетом статистического анализа StatSoft 8.0 с применением параметрических и непараметрических методов сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было отмечено, что у мышей после введения препарата Иммуовак достоверно повышался уровень IL-1β, IL-6, IL-12, IL-5 (табл. 1, рис. 1). При

этом концентрации их различались в зависимости от метода введения. IL-1β при пероральном и интраназальном методах повышался почти в 3,5 раза, при подкожном – в 13,0 раз, IL-6 при пероральном методе увеличивался в 2,8 раза, при интраназальном – в 2,4 раза, подкожном – в 4,5 раза по сравнению с контрольной группой. Уровень IL-12 увеличивался почти в 2,5 раза (интраназальное и пероральное введение) и в 7,4 раза (подкожное введение). Менее значимо возрастал уровень IL-5 – в 1,7; 2,0 и 3,8 раза – соответственно при интраназальном, пероральном и подкожном методах аппликации. Уровни IL-10, IL-4, TNF оставались без изменений. При подкожном методе введения вакцины в сыворотках мышей концентрация IFN-γ увеличивалась в 5 раз по сравнению с интактными животными.

Регуляторные IL-12 и IFNγ, играющие существенную роль в индукции пролиферации Т-лимфоцитов по Th1 пути, особенно важны при подкожном введении антигенов. В наших исследованиях при этом методе они экспрессировались в наибольшей степени. В целом все способы иммунизации комплексом антигенов условно патогенных микроорганизмов повышали экспрессию регуляторного цитокина IL-12. Данный цитокин продуцируется в основном дендритными клетка-

Таблица 1

Уровень цитокинов в сыворотках мышей при различных методах введения вакцины Иммуовак ВП-4

Метод введения вакцины	Содержание цитокинов, пкг/мл							
	IL-1β	IL-6	IL-10	IL-12	IL-4	IL-5	IFN-γ	TNF
Пероральный	17,8 ± 0,6*	132,0 ± 16,3*	37,5 ± 2,8	12,5 ± 1,5*	5,8 ± 0,8	43,6 ± 1,5*	7,5 ± 1,1	30,5 ± 3,1
Интраназальный	18,2 ± 0,7*	115,0 ± 25,6*	39 ± 3,3	13,2 ± 1,2*	6,8 ± 0,7	55,5 ± 12,6*	7,3 ± 0,5	33,7 ± 2,1
Подкожный	68,3 ± 3,2*	215,0 ± 15,8*	41,2 ± 4,5	38,6 ± 2,7*	5,5 ± 0,4	98,3 ± 9,8*	36,6 ± 2,8*	36,6 ± 2,8
Контроль (интактные мыши)	5,2 ± 0,5	46,8 ± 3,3	36,3 ± 3,8	5,2 ± 0,6	5,4 ± 0,6	25,7 ± 2,1	7,2 ± 0,5	28,3 ± 2,1

Примечание: * – достоверность различий между контрольной и опытными группами $p < 0,05$.

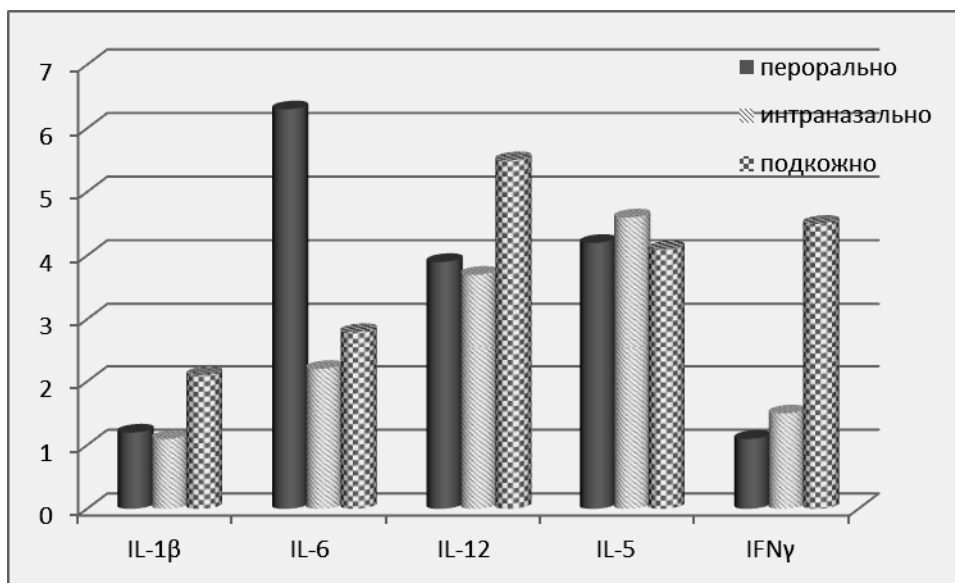


Рис. 1. Увеличение уровня цитокинов в сыворотке крови мышей, вакцинированных препаратом Иммуовак ВП-4 разными методами. По оси ординат – отношение концентрации цитокинов в опытных группах к контрольной. По оси абсцисс – исследуемые цитокины.

ми (ДК), фагоцитами (моноцитами/макрофагами и нейтрофилами), а также В-клетками в ответ на патогены [10]. IL-12 в синергизме с TNF- α , IL-18, IL-1 и IL-15 может индуцировать продукцию большого количества INF- γ натуральными киллерами (NK), что является важным событием в ранней фазе врожденного иммунного ответа [6]. IL-12 действует не только на NK-клетки, но также на NKT и Т-клетки, индуцируя пролиферацию, цитотоксическую активность и дифференцировку Th1-клеток [9]. Под воздействием IL-12 Т- и NK-клетки продуцируют INF- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-3, IL-8 и IL-2. При этом активированные NK и Т-клетки, выделяя INF- γ , также усиливают продукцию IL-12, что свидетельствует о существовании позитивной обратной связи между эффекторами адаптивного и врожденного иммунитета [7]. IL-12 способствует активации В-клеток, особенно В1, что находит отражение в повышении уровня аутоантител, но при этом подавляет выработку IgE, в то время как количество Ig2a, зависящего от INF- γ , повышается [12].

Иммуновак в наших экспериментах при всех методах введения также способствовал продукции в сыворотках мышей IL-5, который продуцируется стимулированными Т-хелперами. В формировании местного иммунитета важная роль принадлежит именно IL-5, так как, стимулируя выработку секреторного IgA, IL-5 способствует проявлению местной защиты слизистых оболочек [3]. Одной из мишеней действия IL-5 является активированная антигеном или митогеном В-клетка. Усиление пролиферации В-клеток под влиянием данного цитокина во многом связано с его способностью индуцировать экспрессию рецептора к IL-2 на этих клетках. Кроме стимуляции пролиферации, IL-5 значительно усиливает продукцию иммуноглобулинов В-клетками, активированными специфическим антигеном или митогеном. Отличительной особенностью IL-5 является его способность переключать В-лимфоциты на синтез IgA. Действие данного цитокина затрагивает и Т-клетки. В присутствии IL-2 он вызывает генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов. [1].

Известно, что IL-1 β , IL-6, IL-12 относятся к цитокинам, индуцирующим дифференцировку клеток Th1-типа. Иммуновак повышал содержание IL-6 в сыворотках животных при всех методах введения. Установлено, что данный цитокин является мощным фактором дифференцировки В- и Т-клеток. Многие клетки вырабатывают IL-6, включая Th2, макрофаги, ДК, фибробласты, эндотелиальные клетки, гепатоциты и др. IL-6 является главным индуктором конечного этапа дифференцировки В-клеток и макрофагов, мощным стимулятором выработки белков острой фазы клетками печени. Одна из основных функций IL-6 — стимуляция продукции антител *in vivo* и *in vitro*. Цитокин усиливает пролиферацию эндотелиальных клеток, является фактором дифференцировки цитотоксических лимфоцитов. Благодаря секреции IL-6, при интраназальной вакцинации мышей генно-инженерной конструкции, содержащей трансфецированные

гены IL-6 в рекомбинантном вирусе коровьей оспы, в легких усиливался специфический локальный IgA ответ на гетерологичный антиген [4].

Только при подкожном введении вакцины Иммуновак статистически значимо в сыворотках повышался уровень INF- γ , который синтезируется в основном Th1-клетками и NK. Но и другие эффекторы при соответствующей стимуляции также способны секретировать INF- γ : Т-клетки (NKT, CD8⁺ Т-клетки и Т $\gamma\delta$ -клетки), макрофаги, ДК и В-клетки [8]. Высвобождающийся INF- γ активирует NK и нейтрофилы, стимулирует микробицидную активность макрофагов и индуцирует формирование гранул, которые играют барьерную функцию для сдерживания внутриклеточных патогенов. Оба типа 1 и 2 интерферонов активируют NK-клетки, направляя их на уничтожение клеток, инфицированных вирусом, и высвобождение цитокинов [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследования показали существенное увеличение продукции регуляторного цитокина IL-12 при всех методах введения комплекса антигенов условно патогенных микроорганизмов в составе вакцины Иммуновак-ВП-4, но более выраженное — при подкожной иммунизации по сравнению с мукозальной. Парантеральный способ аппликации вакцины приводил также к значительному повышению уровня INF- γ в сыворотке экспериментальных мышей. При всех исследованных методах наблюдалось практически одинаковое содержание в сыворотке IL-6, а также IL-5, регулирующего продукцию иммуноглобулинов класса А, играющего основную роль в реакциях местного иммунитета.

Выявленный в эксперименте цитокиновый профиль мышей подтвердил, что независимо от метода введения препарата Иммуновак происходит активация эффекторов иммунной системы, о чем свидетельствует повышение уровня провоспалительных и регуляторных цитокинов. Следовательно, введение антигенов условно патогенных микроорганизмов инициирует активацию целого каскада иммунологических реакций, и под воздействием синтезированных цитокинов происходит поляризация иммунного ответа преимущественно по Th1 типу.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-96037p_урал_a и Администрацией Пермского края.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галактионов В.Г. Иммунология. — М.: Нива России, 2000. — 488 с.
2. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Ожидаемые события в развитии вакцинопрофилактики до 2020 — 2030 гг. // ЖМЭИ. — 2010. — № 2. — С. 105 — 111.
3. Ярилин А.А. Иммунология. — М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2010. — 220 с.
4. Banyer J.L., Hamilton N.H., Ramshaw I.A., Ramsaw A.J. Cytokines in innate and adaptive immunity // Rev. Immunogenet. — 2000. — Vol. 2. — P. 359 — 373.

5. Bermúdez-Humarán L.G., Kharrat P., Chatel J.M., Langella P. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines // *Microb Cell Fact.* – 2011. – Vol. 10. – P. 36–34.

6. Dowell A.C., Oldham K.A., Bhatt R.I., Lee S.P. et al. Long-term proliferation of functional human NK cells, with conversion of CD56(dim)NK cells to a CD56 (bright) phenotype, induced by carcinoma cells co-expressing 4-1BBL and IL-12 // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2011. – Vol. 15. – P. 245–251.

7. Lu T.X., Hartner J., Lim E.J. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187, N 6. – P. 3362–3373.

8. Netea M.G., Kullberg B.J., Van der Meer J.W.M. Proinflammatory cytokines in the treatment of bacterial and fungal infections // *Biodrugs.* – 2004. – Vol. 18. – P. 9–22.

9. Roberts-Thomson I.C., Fon J., Uylaki W., Cummins A.G. et al. Cells, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2011. – Vol. 5, N 6. – P. 703–716.

10. Sloan E., Henriquez R., Kinchington P., Slobodman B. et al. Varicella zoster virus inhibition of the NFκB pathway during infection of human dendritic cells: role for ORF61 as a modulator of NFκB activity // *J. Virol.* – 2011. – Vol. 16. – P. 221–227.

11. Zeromski J., Mozer-Lisewska I., Kaczmarek M., Kowala-Piaskowska A. et al. NK cells prevalence, subsets and function in viral hepatitis C // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2011. – Vol. 59, N 6. – P. 449–455.

12. Zhang S., Cubas R., Li M., Chen C. et al. Virus-like particle vaccine activates conventional B2 cells and promotes B cell differentiation to IgG2a producing plasma cells // *Mol. Immunol.* – 2009. – Vol. 46, N 10. – P. 1988–2000.

Сведения об авторах

Ахматова Нелли Кимовна – заведующая лабораторией регуляции иммунитета ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, доктор медицинских наук

Лебединская Ольга Витальевна – доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития, доктор медицинских наук (614039, г. Пермь, ул. П. Осипенко, д. 61, кв. 74; e-mail: lebedinska@mail.ru)

Бродовский Максим Борисович – заочный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития

Ахматов Элвин Альтафович – лаборант-исследователь лаборатории терапевтических вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН

Лебединская Елена Александровна – старший научный сотрудник ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», кандидат медицинских наук

Ильиных Елизавета Анатольевна – заочный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития

Курбатова Екатерина Алексеевна – заведующая лабораторией терапевтических вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, доктор медицинских наук, профессор