

УДК 616.982.27-039:576.851.132

Использование цитокинов для усиления иммуногенных и иммуностропных свойств антигенов *Burkholderia pseudomallei*

С.И. Жукова, О.Б. Демьянова, В.В. Алексеев, И.В. Авророва, Н.П. Храпова,
Н.М. Дрефс, А.А. Занкович

Научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград, Россия

Use of cytokines for enhancement of immunogenic and immunotropic attributes of *Burkholderiapseudomallei* antigens

S.I. Jukova, O.B. Dem'yanova, V.V. Alekseev, I.V. Avrorova, N.P. Hrapova, N.M. Drefs,
A.A. Zankovich

Аннотация

В работе изучали возможность усиления иммуногенных и иммуностропных свойств и повышения протективности мелиоидозных антигенов препаратами рекомбинантных цитокинов при иммунопрофилактике экспериментального мелиоидоза. Белых беспородных мышей иммунизировали комплексом мелиоидозных антигенов 6 и d (АГ6+d) двукратно, подкожно, с интервалами 10 сут. Одновременно с иммунизацией вводили ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-1 и ИЛ-2 в разных сочетаниях. На мышах BALB/c изучали влияние цитокинов на митогенную активность Ag6+d в отношении В-клеток при моделировании иммунного ответа к эритроцитам барана (ЭБ). Показано, что введение ИФН- γ при первичной иммунизации, а ИЛ-2 - при вторичной приводило в конце периода иммуногенеза к возрастанию уровня ГЗТ в 1,59 раза, степени экспрессии Fc-рецепторов на нейтрофилах в 1,69 раза и увеличению протективности комплекса АГ6+d (50% выживших мышей от 15 ЛД₅₀ *B.pseudomallei* 100). Введение мышам BALB/c ИЛ-1 при первичной иммунизации АГ6+d, и ИЛ-2 - при вторичной приводило к увеличению в 7,6 раза числа В-клеток селезенки, продуцирующие антитела к ЭБ.

Ключевые слова

Мелиоидоз, мелиоидозные антигены, иммунитет, рекомбинантные цитокины.

Мелиоидоз - особо опасная тропическая инфекция, вызываемая *Burkholderia pseudomallei* и характеризующаяся высокой летальностью. Смертность от острого мелиоидоза в госпита-

Summary

Possibility of enhancement of immunogenic and immunotropic attributes and increase of protective activity of melioidosis antigens by recombinant cytokines during immunoprophylaxy of experimental melioidosis have been studied in the work. The outbred mice were immunized with the complex of melioidosis antigens 6 and d (Ag6+d) twice subcutaneously with 10 days interval. Simultaneously IFN- α , IFN- γ , IL-1 and IL-2 were injected in different combinations. Influence of cytokines on mitogenic activity of Ag6+d in relation to B-cells by modulation of immune response to sheep erythrocytes was studied on mice BALB/c. It was shown that injection of IFN- γ by the primary and IL-2 by the secondary immunization led at the end of the period of immunogenesis to the increase of the level of delayed type of hypersensitivity in 1,59, the level of expression of Fc-receptors on neutrophils in 1,69 and increase of protectivity of the Ag6+d complex (50% of survived mice from 15 LD₅₀ *B.pseudomallei* 100). Injection of IL-1 to outbred mice by the primary immunization by Ag6 +d and IL-2 by the secondary immunization led to the rise of the number of spleen B-cells in 7,6 that produced antibodies to the sheep erythrocytes.

Key words

Melioidosis, melioidosis antigens, immunity, recombinant cytokines.

лях Таиланда достигает 95% [1]. Хроническая форма болезни отличается тяжелым течением и резистентностью к антибиотикотерапии. Актуальность проблемы мелиоидоза для России

связана с возможностью завоза инфекции, учитывая интенсивность современных международных контактов: рост туризма, торговых и культурных связей. Существует также потенциальная угроза применения возбудителя мелиоидоза в качестве агента биотерроризма [2].

Специфическая профилактика мелиоидоза не проводится в связи с отсутствием вакцины, хотя работы по ее созданию продолжают много лет как в нашей стране, так и за рубежом. Показано, что ряд поверхностных антигенов возбудителя вызывает формирование резистентности к инфекции, уровень которой не позволяет считать их высокопротективными [3], поэтому достаточно важной проблемой является поиск препаратов, стимулирующих как специфический иммунный ответ, так и систему врожденного иммунитета, отвечающую за резистентность к широкому кругу микроорганизмов.

Цель работы:

Изучение влияния цитокинов на иммуногенные и иммуностимулирующие свойства мелиоидозных антигенов.

Материалы и методы

Работа выполнена на беспородных белых мышках и мышках линии BALB/c. В качестве иммуногена использовали комбинацию из двух поверхностных мелиоидозных антигенов: антигена б и антигена d (АГб+d), полученных с помощью ионообменной гельхроматографии из клеток *Burkholderia pseudomallei* 57576. Иммуногенные свойства АГб+d (далее - АГ) изучали на беспородных белых мышках, которым вводили 50 мкг АГ по белку, подкожно, с интервалом 10 сут. Одновременно с иммунизацией и в последующие 2 сут животным вводили подкожно препараты рекомбинантных цитокинов: ИЛ-1 (беталейкин) – 0,4 нг, ИЛ-2 (ронколейкин) – 0,6 мкг, ИФН- α (интераль) – 400 МЕ, ИФН- γ (ингарон) – 8 МЕ. Препараты ИЛ-1, ИФН- α и ИФН- γ использованы для стимуляции первичного иммунного ответа, препарат ИЛ-2 – вторичного.

В динамике иммунного ответа на 3, 10 и 18 сут после введения АГ у части животных (по 5 мышей в группе) определяли показатели иммунитета: титр специфических антител в ИФА [4], уровень реакции ГЗТ в тесте отека лапок [5] и степень экспрессии Fc-рецепторов (FcR) на поверхности перитонеальных макрофагов (Мф) и нейтрофилов (Нф). От экспрессии FcR судили по розеткообразованию Мф и Нф с эритроци-

тами барана (ЭБ), опсонизированными против эритроцитарными кроличьими антителами [6]. Определяли процент Мф и Нф, адсорбированных 3 и более ЭБ (ЕА-РОК).

При изучении влияния рекомбинантных цитокинов на иммуностимулирующие свойства АГ мышей BALB/c подкожно иммунизировали АГ (30мкг по белку) изолированно и в сочетании с цитокинами и одновременно с первичной и вторичной иммунизацией дополнительно вводили внутривенно ЭБ (5×10^8), а контрольной группе интактных животных – только ЭБ (без антигенов и цитокинов), после чего на 5 сут в селезенках мышей определяли число антителообразующих клеток (АОК) методом локального гемолиза в геле по Эрне [7].

С целью оценки влияния цитокинов на протективные свойства АГ проводили контрольное заражение животных на 21 сут после первичной иммунизации высоковирулентным штаммом *B.pseudomallei* 100. За зараженными животными наблюдали 30 сут, после чего подсчитывали показатели летальности: процент павших и среднюю продолжительность жизни (СПЖ).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по Фишеру-Стьюденту [8], а также с использованием непараметрического критерия Вилкоксона [9]. При обработке данных по гуморальному иммунному ответу определяли среднегеометрические титры антител [8].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных экспериментов было показано, что при стимуляции только первичного иммунного ответа применение ИФН- γ в наибольшей степени активировало показатели клеточного иммунитета и макрофагально-фагоцитарного звена, применение ИЛ-1 было несколько менее эффективным, а наименьшей иммуностимулирующей активностью обладал ИФН- α (табл. 1, 2, рис. 1). В частности, на 3 сут наблюдения отношение уровня ГЗТ в группах животных, получавших вместе с АГ цитокины, к таковому у мышей, иммунизированных только АГ (индекс стимуляции - ИС), было при использовании ИФН- γ -1,52 ($p < 0,05$); ИЛ-1-1,31; ИФН- α -0,81) (табл. 1, 2). ИС, отражающие превышение показателей экспрессии FcR на Мф и Нф мышей, получавших цитокины, над таковыми в группе животных, иммунизированных только АГ, составляли для Мф – при применении ИФН- γ – 1,43 ($p < 0,05$); ИЛ-1-

Таблица 1. Влияние рекомбинантных цитокинов на динамику изменения ГЗТ в процессе иммуногенеза у мышей

Препараты	Уровень ГЗТ (ИР, %)		
	3 сут	10 сут	18 сут
АГ	16,17±2,44	18,1±1,62*	17,3±0,8*
АГ+ИЛ-1	21,26±0,91*	26,2±2,07*	19,45±1,04*
АГ + ИФН-α	13,19±2,04	19,0±1,91*	16,05±2,21
АГ+ ИЛ-2	15,3±1,68	18,8±1,46*	19,56±1,61*
АГ+ ИЛ-1 + ИЛ-2	20,73±1,01*	25,03±2,11*	26,7±2,14*
Контроль (интактные)	14,76± 2,26	12,8±1,8	12,16±0,64

Примечание: * - различия с контролем статистически достоверны (p<0,05)

Таблица 2. Влияние ИФН-γ на уровень ГЗТ к мелиоидозным антигенам

Препараты	Уровень ГЗТ (ИР, %)		
	3 сут	10 сут	18 сут
АГ	12,9±0,84	21,15±0,91*	19,4±0,64*
АГ + ИФН-γ	19,62±1,65*	26,34±0,93*	24,13±1,14*
АГ+ ИФН- γ +ИЛ-2	18,86±1,86*	26,81±1,05*	30,85±2,12*
Контроль (интактные)	10,8± 0,94	11,52±0,86	10,92±1,1

Примечание: * - различия с контролем статистически достоверны (p<0,05)

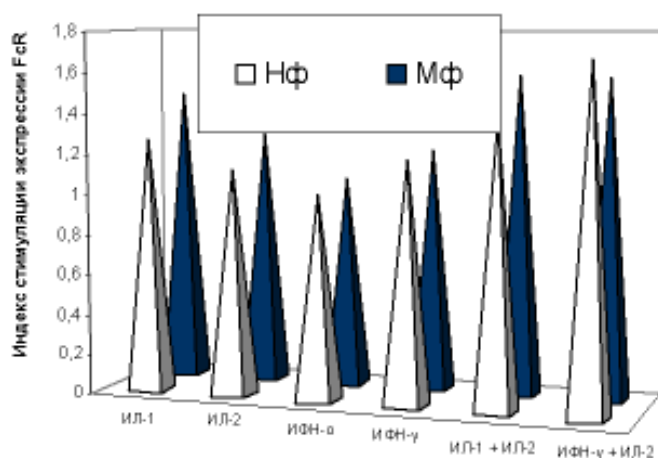


Рис. 1. Сравнительная активность цитокинов при стимуляции экспрессии FcR на макрофагах и нейтрофилах иммунизированных мышей на 18 сут наблюдения

1,38 (p<0,05); ИФН-α -1,19, для Нф- при использовании ИФН-γ -1,41 (p<0,05), ИЛ-1- 1,25 (p<0,05); ИФН-α -1,04 (рис 1.). При изолированном использовании ИЛ-2 для стимуляции вторичного иммунного ответа показатели уровня ГЗТ и экспрессии FcR на фагоцитах были близки к аналогичным показателям в группе мышей, получавших ИЛ-1 при первичной иммунизации.

Наиболее высокие показатели клеточного иммунитета зарегистрированы при стимуляции как первичного, так и вторичного иммунного ответа по схемам: ИФН-γ + ИЛ-2 и ИЛ-1 + ИЛ-2. Так, в завершающий период иммуногенеза, на 18 сут наблюдения ИС для уровня ГЗТ составлял при воздействии по схеме ИФН-γ + ИЛ-2-1,59; по схеме ИЛ-1 + ИЛ-2 - 1,54; при использовании только одного цитокинового пре-

парата ИС колебался в пределах от 0,92 (для ИФН- α) до 1,24 (для ИФН- γ). Подобная же закономерность прослеживалась и в отношении стимуляции сочетаниями цитокинов экспрессии FcR на фагоцитах, в частности, на 18 сут ИС экспрессии FcR на Нф составлял при использовании ИФН- γ + ИЛ-2 – 1,69 ($p < 0,05$); ИЛ-1 + ИЛ-2 – 1,41 ($p < 0,05$); ИФН- γ – 1,2 ($p < 0,05$); ИЛ-1 – 1,27 ($p < 0,05$); ИЛ-2 – 1,13; ИФН- α – 1,02.

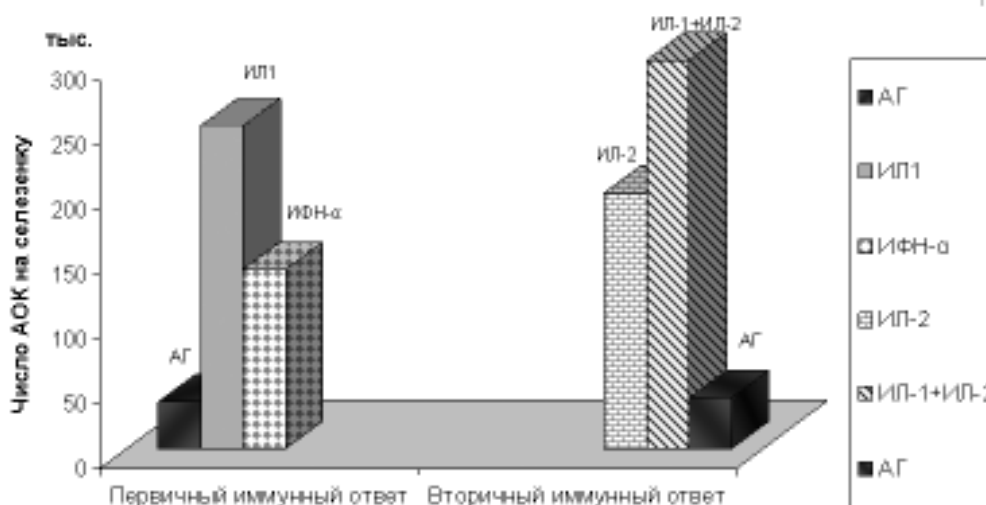
При анализе влияния рекомбинантных цитокинов на гуморальное звено иммунитета было показано, что ИЛ-1 способствовал появлению минимальных титров антител (1:10) уже в ранние сроки (3 сут) после иммунизации, на 10 сут наблюдения средний титр антител при использовании ИЛ-1 составлял 1:40, при применении ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-2 и при использовании антигенов без цитокинов – 1:20. На 18 сут у мышей, получавших только мелиоидозные антигены, средний титр составлял 1:67. В группах мышей, стимулированных отдельными цитокинами (ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-1, ИЛ-2), а также сочетанием двух цитокинов (ИЛ-1 + ИЛ-2 и ИФН- γ + ИЛ-2) титр антител был одинаковым и составлял 1:320.

Таким образом, включение рекомбинантных цитокинов в схему иммунизации совместно с мелиоидозными антигенами повышало показатели клеточного и гуморального иммунитета и макрофагально-фагоцитарной системы. При изолированном применении одного цитокинового препарата, вводимого

при первичной (ИЛ-1, ИФН- α , ИФН- γ) или при повторной иммунизации (ИЛ-2) наиболее существенные сдвиги в показателях уровня ГЗТ и степени экспрессии FcR на Мф и Нф отмечены при использовании совместно с первичной иммунизацией ИФН- γ . Повышенные активности гуморального звена иммунитета в ранние сроки (на 3, 10 сут) иммуногенеза в большей степени ассоциировалось с использованием ИЛ-1, в то время как к концу срока наблюдения (18 сут) не выявлено различий в титрах антител у животных, получавших разные цитокины или их сочетания, хотя во всех этих группах титр антител значительно превышал таковой у мышей, иммунизированных антигенами без цитокинов (1 : 320 по сравнению с 1:67).

При воздействии цитокинами на первичный и вторичный иммунный ответ более выраженную стимуляцию показателей иммунитета обеспечивала схема ИФН- γ + ИЛ-2.

В экспериментах на мышах BALB/c были изучены иммуотропные свойства поверхностного мелиоидозного комплекса АГ6+d, а также влияние на них рекомбинантных цитокинов в процессе иммуногенеза. Было показано, что введение мышам ИЛ-1 вместе с АГ в 6,9 раза ($p < 0,05$) увеличивало способность АГ вызывать неспецифическую (поликлональную) активацию В-клеток, продуцирующих IgM к ЭБ, а использование ИФН- α увеличивало число АОК в 3,8 раза ($p < 0,05$) (рис. 2).



Влияние рекомбинантных цитокинов на иммуотропные свойства мелиоидозных антигенов при первичном и вторичном иммунном ответе

При изолированном применении (без цитокинов) мелиоидозный антигенный комплекс АГ6+d незначительно (в 1,3 раза) по сравнению с контролем (интактные животные) увеличивал число АОК к ЭБ. При вторичной иммунизации АГ не оказывал заметного иммуностропного влияния на В-клетки селезенки мышей BALB/c. Однако, в группах животных, получавших вместе с АГ ИЛ-2 или ИЛ-1+ИЛ-2, зарегистрировано существенное увеличение числа АОК к ЭБ (в 5 и 7,6 раз соответственно, $p < 0,05$), что свидетельствует об увеличении митогенной активности мелиоидозных антигенов под влиянием этих цитокинов.

Таким образом, применение препаратов рекомбинантных цитокинов для стимуляции первичного или (и) вторичного иммунного ответа при иммунизации мелиоидозными антигенами существенно повышало уровень неспецифического митогенного действия этих антигенов на В-лимфоциты селезенки. Поликлональная активация В-клеток была в большей степени выражена при стимуляции иммуногенеза с помощью ИЛ-1 и ИЛ-1 в сочетании с ИЛ-2.

Изучение влияния цитокинов на протективные свойства поверхностного мелиоидозного антигенного комплекса на белых мышах показало, что стимуляция первичного и вторичного иммунного ответа способствовала более высоким показателям выживаемости и СПЖ по сравнению с воздействием цитокинами только на первичный или только на вторичный ответ. Наиболее эффективной схемой стимуляции была схема ИФН-g + ИЛ-2: выживаемость от 15 ЛД₅₀ *B.pseudomallei* 100 составляла 50 % ($p < 0,05$), при использовании схемы ИЛ-1 + ИЛ-2 – 43%, показатели СПЖ в данных группах достоверно превышали СПЖ контрольных интактных мышей ($p < 0,05$).

В современной медицине цитокины достаточно широко используются в качестве средств иммунотерапии при различных патологических состояниях, сопровождающихся снижением иммунитета. Рекомбинантные цитокины применяют для усиления действия антибактериальных, противовирусных и других средств при инфекционных и соматических заболеваниях: сепсисе различной этиологии, микотических инфекциях, хламидиозе, туберкулезе, герпесе, онкологических заболеваниях [10]. В последние годы появились сообщения о применении цитокинов в качестве иммуноадьювантов при вакцинопрофилактике некоторых инфекций: гепатитов А и В, клещевого энцефалита, бешен-

ства [11]. В отношении мелиоидоза подобных исследований по стимуляции цитокинами иммуногенных свойств антигенов *B.pseudomallei* ранее не проводилось.

Подводя итог проведенным нами экспериментам, следует отметить, что цитокины, преимущественно воздействующие на клеточные механизмы защиты, способствовали повышению протективности антигенов как при использовании их для стимуляции первичного иммунного ответа, так и вторичного. Более эффективным было комбинированное применение двух цитокинов: ИФН- γ + ИЛ-2. Как известно, иммунитет при мелиоидозе зависит в основном от клеточных факторов защиты [12], поэтому повышение протективности антигенов *B.pseudomallei* связано с максимальным вовлечением в процесс иммуногенеза субпопуляций Т-клеток. Применение ИФН- γ позволяет на самых ранних этапах иммунной перестройки стимулировать неспецифические клеточный реакции, прежде всего, за счет активации макрофагально-фагоцитарного звена иммунитета, а также усиливать иммунологические реакции с участием Т-хелперов. Дополнительная стимуляция вторичного иммунного ответа ИЛ-2, являющимся преимущественно Т-клеточным ростовым фактором, способствовала более полноценному формированию специфического иммунитета за счет активации процессов пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов.

В настоящее время считается, что при конструировании вакцинных препаратов необходимо учитывать не только иммуногенные, но и иммуностропные свойства антигенов, т.е. их способность неспецифически воздействовать на иммунокомпетентные клетки, модулируя, таким образом, их активность в сторону повышения или понижения. Микробные антигены с выраженными митогенными свойствами, как правило имеют в своем составе ПАМС – патоген-ассоциированные молекулярные структуры, которые распознаются Toll-подобными рецепторами клеток системы врожденного иммунитета – макрофагов, дендритных клеток, моноцитов, нейтрофилов, а также Т и В – лимфоцитов. По современным представлениям, активация системы врожденного иммунитета подобными микробными антигенами способна создать быструю защиту от любого патогена [13]. Нами было показано, что введение мышам BALB/c вместе с АГ6+d рекомбинантных цитокинов существенно повышало продукцию IgM к эритроцитам барана В-клетками селезенки,

причем в большей степени митогенная активность мелиоидозных антигенов возрастала при совместно стимуляции первичного и вторичного иммунного ответа двумя цитокиновыми препаратами.

Заключение

Препараты рекомбинантных цитокинов могут быть использованы в качестве иммуноадьювантов при создании искусственного иммунитета к мелиоидозной инфекции с помощью поверхностных антигенов. Использование для стимуляции первичного иммунного ответа ИФН- γ , а вторичного - ИЛ-2 в наибольшей сте-

пени повышало степень реакции ГЗТ и активировало макрофагально-фагоцитарное звено иммунитета, что выражалось в существенном повышении уровня экспрессии Fc-рецепторов на поверхности фагоцитов. Повышение клеточного иммунитета приводило, в конечном итоге, к увеличению протективности данных антигенов для белых мышей. Цитокиновые препараты увеличивали иммуностимулирующую активность мелиоидозных антигенов в отношении В-клеток селезенки.

Полученные данные могут быть использованы при разработке химической вакцины против мелиоидозной инфекции.

Литература

1. Cheng A.C., Syepfans D.P., Anstey N.M. et al. Adjunctive granulocyte colony-stimulating factor for treatment of septic shock due to melioidosis. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38: 1: 32-37.
2. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Жилина Н.Л. и соавт. Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму. Волгоград: Нижневолжское книжное издательство; 2004: 25.
3. Пивень Н.Н., Смирнова В.И., Викторов Д.В. и соавт. Иммуногенность и гетерогенность поверхностного антигена 8 Ppseudomallei. *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1996; 4: 75-78.
4. Яковлев А.Т., Зыкин Л.Ф., Рыбкин В.С. Иммуноферментный анализ в микробиологии. Саратов; 1990; 108.
5. Попова А.Е. Методические рекомендации по определению отекогенного эффекта на белых мышах. Волгоград: Нижневолжское книжное изд-во; 1980; 18.
6. Родионов С.В., Щербухин В.В., Николаева Е.Н. и соавт. Перераспределение субпопуляций перитонеальных макрофагов, несущих Fc-рецепторы, под влиянием иммуномодулятора. *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1988; 1: 97-107.
7. Jerne N.R., Henry G., Nordin A.A. et al. Plague-forming cells: methodology and theory. *Transpl.Rev.* 1974; 18: 130-131.
8. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л; 1962; 180.
9. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. М: Медицина; 1973; 141.
10. Смирнов М.Н., Малинин В.В., Кетлинский С.А. Терапия вторичных иммунодефицитных состояний пептидными биорегуляторами. Иммунодефицитные состояния. Под ред. В.С. Смирнова, И.С. Фрейдлина. Санкт-Петербург: Фолиант; 2000; 477-533.
11. Авдеева Ж.И., Алпатова И.А., Медуницын Н.В. Препараты системы цитокинов. Цитокины и воспаление. 2002; 2: 33.
12. Тихонов Н.Г., Рыбкин В.С., Жукова С.И. и соавт. Иммунология мелиоидоза. Мелиоидоз: Сб. научн. трудов Волгоград. н.-исслед. противочумн. ин-та. Волгоград: Нижневолжское книжное изд-во; 1995; 119-141.
13. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов. *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007; 4: 93-100.

Поступила 23.03.2010 г.