

УДК 616.517

DOI: 10.14427/jipai.2024.2.59

## Спонтанная и липополисахарид-индуцированная продукция цитокинов в супернатантах культур клеток, изолированных из кожного биоптата, в модели острого псориазоподобного дерматита у мышей

Е.В. Сорокина<sup>1,2</sup>, Э.А. Ахматова<sup>1</sup>, Е.Ю. Сенцова<sup>3</sup>, И.В. Бишева<sup>1</sup>, В.Н. Столпникова<sup>1</sup>, Е.О. Калиниченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

<sup>2</sup> Академия постдипломного образования Федерального научно-клинического центра Федерального медико-биологического агентства России, Москва

<sup>3</sup> Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва

## Spontaneous and LPS-induced cytokine production in supernatants of cell cultures isolated from a skin biopsy in a mouse model of acute psoriasis-like dermatitis

E.V. Sorokina<sup>1,2</sup>, E.A. Akhmatova<sup>1</sup>, I.V. Bisheva<sup>1</sup>, V.N. Stolpnikova<sup>1</sup>, E.O. Kalinichenko<sup>1</sup>, S.A. Skhodova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Postgraduate Education Academy of Federal medical and biological Agency, Moscow, Russia

<sup>3</sup> P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute, Russia

### Аннотация

**Целью** выполненной работы было получение данных о спонтанной и липополисахарид(ЛПС)-стимулированной продукции цитокинов в супернатантах культур клеток, изолированных из кожного биоптата, взятого у мышей линии C57BL/6 при воспроизведении имиквимод-индуцированной модели псориаза.

**Методы.** Клетки из кожного биоптата изолировали с применением метода спонтанной миграции и метода ферментативной диссоциации с использованием раствора коллагеназы. Культивирование клеток, изолированных из кожи, осуществляли 24 часа в среде RPMI-1640 (спонтанная продукция цитокинов) или RPMI-1640 с добавлением раствора (10 мкг/мл) ЛПС *E. coli* (индуцированная). Уровень цитокинов определялся методом проточной лазерной цитофлюориметрии с применением мультиплексной тест-системы *Mouse Th1/Th2/Th17* (Antigenix America, США) на цитометре FC-500.

**Результаты.** В очаге имиквимод-индуцированного воспаления наблюдалось усиление спонтанной продукции провоспалительных цитокинов IL-1, IL-5, IL-17 в 2,4-3,8 раз. В то же время было выявлено угнетение в 1,9 раз синтеза IFN $\gamma$  при культивировании клеток кожи в присутствии бактериального ЛПС.

### Ключевые слова

Имиквимод, воспаление, цитокины, псориаз.

### Summary

**The purpose** of the work performed was to obtain data on spontaneous and LPS-stimulated cytokine production in cell culture supernatants isolated from skin biopsies of C57BL/6 mice in an imiquimod-induced psoriasis model.

**Methods.** Skin cells were isolated by spontaneous migration and enzymatic dissociation in a collagenase solution. Cells isolated from the skin were cultured for 24 hours in RPMI-1640 (spontaneous cytokine production) or RPMI-1640 medium with the addition of a solution (10 micrograms/ml) of *E. coli* LPS (induced). Cytokine levels were determined by flow laser cytofluorometry using the *Mouse Th1/Th2/Th17* multiplex test system (Antigenix America, USA) on an FC-500 cytometer.

**Results.** In the focus of imiquimod-induced inflammation, an increase in the spontaneous production of proinflammatory cytokines IL-1, IL-5, IL-17 was observed by 2.4-3.8 times. At the same time, a 1.9-fold inhibition of IFN $\gamma$  synthesis was detected when cultivating skin cells in the presence of bacterial LPS.

### Keywords

Imiquimod, inflammation, cytokines, psoriasis.

## Введение

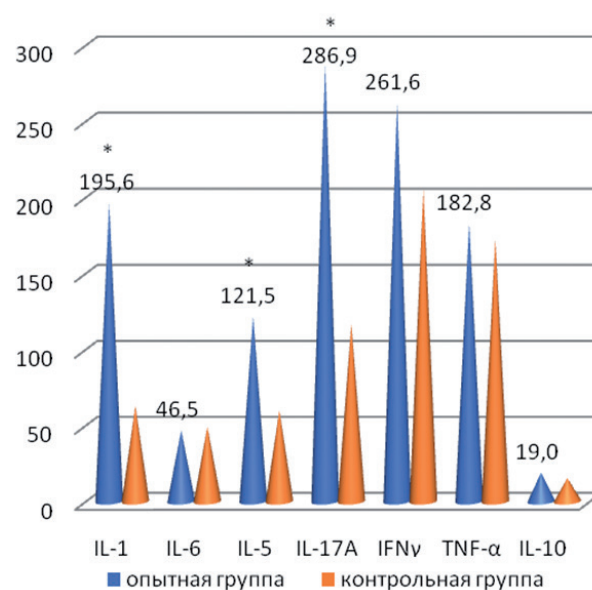
Псориаз – это хроническое воспалительное заболевание со сложными патогенетическими механизмами, которые приводят к аномальным иммунным реакциям с клинической манифестацией на коже в виде эритематозных, шелушащихся бляшек. При псориазе наблюдается aberrантная пролиферация кератиноцитов, паракератоз и хроническое воспаление [1]. Ведущее значение в патогенезе псориаза принадлежит иммунным нарушениям. Активация иммунокомпетентных клеток, наблюдающаяся при псориазе, сопровождается дисбалансом в продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Рядом исследований установлено, что к цитокинам, участвующим в патогенезе псориаза, относятся интерлейкины IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-22, IL-23, интерферон- $\alpha$ , фактор некроза опухоли- $\alpha$  TNF- $\alpha$  и интерферон- $\gamma$  IFN $\gamma$  [2]. В патофизиологии псориаза превалирующую роль играют Th1 и Th17 клетки и их провоспалительные цитокины. TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-12 и IL-23 имеют важнейшее значение в патогенезе, что послужило основанием для создания новых подходов к терапии. Противовоспалительная защита обеспечивается Th2 и Treg клетками, однако имеются противоречивые результаты в отношении их регуляторной активности. Изучение патофизиологии псориаза демонстрирует взаимодействие между иммунными и неиммунными клетками, что может сделать ведение пациентов сложной задачей, одновременно открывая путь для разработки новых терапевтических стратегий, отвечающих требованиям к более эффективным препаратам. В настоящее время в научных и доклинических исследованиях с целью анализа действия терапевтических средств для лечения псориаза на патогенетические звенья и оценки их эффекта активно используются экспериментальные модели псориазоподобного дерматита, вызванного имиквимодом, являющиеся наиболее удобными и экономичными [3].

**Целью** работы было изучение продукции цитокинов клетками, изолированными из кожи мышей в модели острого псориазоподобного дерматита.

## Материалы и методы

Из представленных данных видно, что в процессе воспроизведения псориазоподобного воспаления у мышей под влиянием аппликаций имиквимода в коже происходит усиление продукции ряда провоспалительных цитокинов: IL-1, IL-5, IL-17. Уровень IL-6, IFN $\gamma$ , IL-10 достоверно не изменялся по сравнению с контрольной группой.

На рис. 2 приведены данные об ЛПС-индуцированной продукции цитокинов в су-



**Рис. 1. Спонтанная продукция цитокинов (в пкг) в супернатантах культуры клеток, полученных из кожного биоптата (метод спонтанной миграции)**

Примечание: \*  $p < 0,05$  – достоверность различий между группами мышей (Mann-Whitney U test).

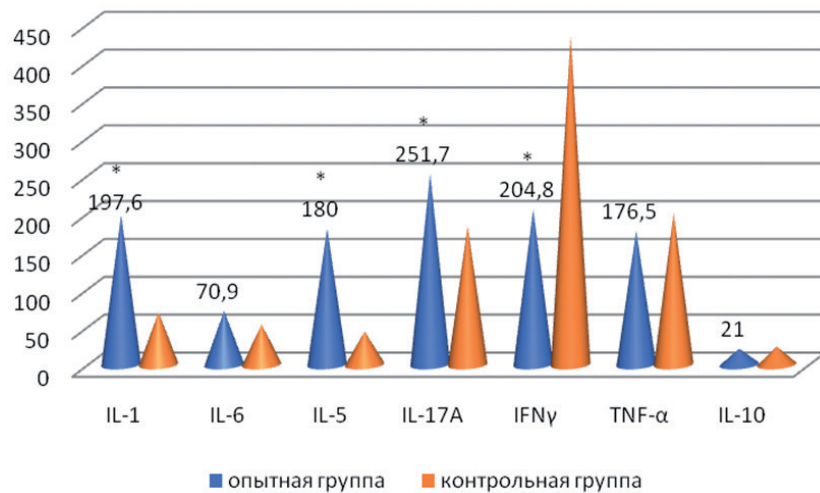
пернатантах клеточной культуры биоптата кожи (метод спонтанной миграции).

Согласно полученным результатам, в очаге воспаления кожи мышей происходит усиление продукции тех же цитокинов, что и в отсутствие индуктора ЛПС: IL-1, IL-5, IL-17. В то же время у мышей со здоровой кожей (контрольная группа) отмечалась более интенсивная продукция IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 по сравнению с мышами с развившимся псориазоподобным воспалением. У мышей с псориазоподобным дерматитом наблюдалось незначительное угнетение синтеза IFN $\gamma$  в присутствии ЛПС (если спонтанная продукция составляла 261,6 пкг/мл, то индуцированная продукция доходила только до 204,8 пкг/мл). В то же время у интактных мышей наблюдалось двукратное усиление продукции IFN $\gamma$  при культивировании клеток в питательной среде с добавлением ЛПС.

Данные по мультиплексному анализу цитокинов в супернатантах клеток кожи мышей, изолированных с помощью обработки биоптата раствором коллагеназы приведены на рис. 3.

При использовании коллагеназного метода для извлечения клеток из кожного биоптата также наблюдалось усиление спонтанной продукции IL-1, IL-5, IL-17A, как и в случае метода спонтанной миграции. Помимо этого, наблюдалась активация синтеза IFN $\gamma$ , а также IL-6.

Уровень продукции цитокинов в супернатантах клеток кожи в присутствии ЛПС отображён на рис. 4.



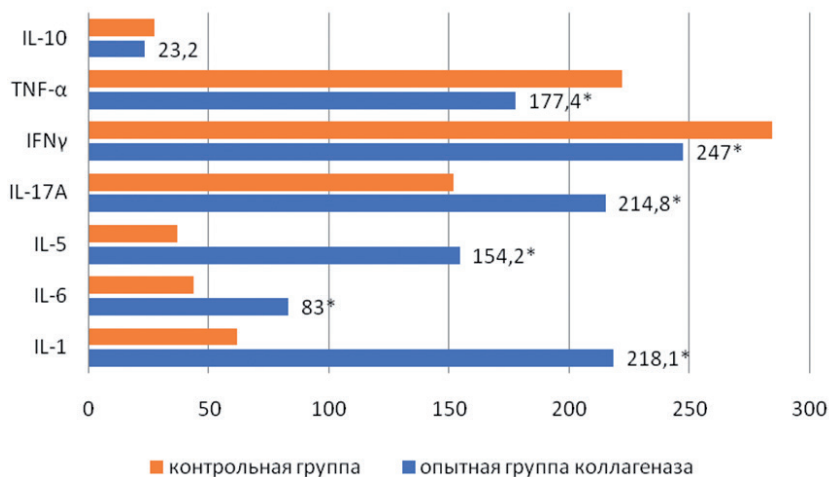
**Рис. 2. Индуцированная продукция цитокинов (в пкг) в супернатантах культуры клеток кожного биоптата (метод спонтанной миграции)**

Примечание: \*  $p < 0,05$  – достоверность различий между группами мышей (Mann-Whitney U test).



**Рис. 3. Спонтанная продукция цитокинов (в пкг) в супернатантах культуры клеток кожного биоптата (коллагеназный метод)**

Примечание: \*  $p < 0,05$  – достоверность различий между группами мышей (Mann-Whitney U test).



**Рис. 4. Индуцированная продукция цитокинов (в пкг) в супернатантах культуры клеток кожного биоптата (коллагеназный метод)**

Примечание: \*  $p < 0,05$  – достоверность различий между группами мышей (Mann-Whitney U test).

Клетки, изолированные из кожи мышей, пораженной псориазоподобным дерматитом при добавлении бактериального липополисахарида продуцируют повышенные количества IL-1, IL-5, IL-17A, а также IL-6. Выработка таких цитокинов, как TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ , в присутствии ЛПС была угнетена у мышей с экспериментальным воспалением.

### Обсуждение

Как было установлено ранее, имиквимод, являясь в химическом отношении имидазохинолоном, попадая на здоровую кожу мышей, связывается с Толл-подобными рецепторами (TLRs) 7 типа, вызывая цепочку воспалительных реакций. Данные, полученные в ходе описываемого эксперимента, указывают на то, что в коже подопытных мышей с воспалением, моделирующим псориазоподобное, накапливаются клетки, продуцирующие провоспалительные цитокины: IL-1, IL-17, IL-5 и регуляторного IFN $\gamma$  в 2,0-4,0 раза интенсивнее, чем у интактных мышей. Продукция же противовоспалительного интерлейкина IL-10 не нарастает, в результате чего создаются условия для персистенции воспаления в псориазоподобном очаге. Эти данные в целом согласуются с данными, приведёнными в работах [3,6], однако в нашем эксперименте достоверного усиления продукции IL-6 и ФНО- $\alpha$  не отмечалось. Результаты, полученные в отношении IL-10, не противоречат данным, приведённым Смирновым В.В. [7]. В ходе культивирования клеток, изолированных из псориазоподобного очага воспаления, в присутствии бактериального ЛПС отмечалось аналогичное нарастание синтеза IL-1, IL-17, IL-5, а также тенденция к усилению синтеза IL-6. При этом наблюдалось угнетение по сравнению с контрольной группой синтеза интерлейкина

IFN $\gamma$ , обладающего регуляторными свойствами. Данный факт угнетения цитокинпродуцирующей способности клеток, вероятно, можно объяснить срывом адаптационных возможностей клеток, испытывающих двойное воздействие стимулов – сначала имиквимода, а затем *in vitro* – ЛПС. При остром имиквимод-индуцированном воспалении в коже мышей отмечали снижение функциональной активности клеток, проявляющейся в снижении спонтанной ЛПС-индуцированной продукции ряда цитокинов.

Таким образом, цитокиновый профиль супернатантов клеток кожи мышей с имиквимод-индуцированным воспалением характеризуется отчётливым провоспалительным характером с отсутствием усиления синтеза противовоспалительного IL-10.

Второй задачей нашего исследования было сравнение двух методов изоляции клеток из кожного биоптата для оценки цитокинпродуцирующей активности клеток. Имеются данные, свидетельствующие о нежелательном влиянии фермента коллагеназы на целостность цитоплазматических мембран клеток [8]. Результаты, полученные в нашем эксперименте, указывают на то, что, в общем, применяя оба эти метода изолирования клеток для изучения цитокинпродуцирующей активности, наблюдаются однотипные значения, но при применении коллагеназного метода спектр выявленных активированных цитокинов оказался немного шире – за счёт продукции IL-6, так что нами не было зафиксировано негативного воздействия коллагеназы на цитокинпродуцирующую активность клеток. Следовательно, оба метода изолирования клеток из кожи можно признать взаимозаменяемыми, исходя из актуальных возможностей лаборатории.

### Литература

1. Niculet E, Radaschin D, Nastase F, et al. Influence of phytochemicals in induced psoriasis. *Exp Ther Med*. 2020 Oct;20(4):3421–3424. doi:10.3892/etm.2020.9013.
2. Пинегин Б.В., Иванов О.Л., Пинегин В.Б. Роль клеток иммунной системы и цитокинов в развитии псориаза. 2013;3:19-25.
3. Жуков А.С., Лавров Н.В., Хайрутдинов В.Р., и др. Модели псориаза на лабораторных животных: современное состояние проблемы. *Иммунология*. 2019;40(2):64-69.
4. Патент №2023139323 от 21.07.2023. Способ формирования экспериментальной модели хронического имиквимод-индуцированного псориазоподобного дерматита у мышей. Российская Федерация, заявитель ФГБНУ «научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».
5. van der Fits L, Mourits S, Voerman J, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*. 2009;1;182(9):5836-45. doi:10.4049/jimmunol.0802999.
6. Miao X, Luo D, Min W, et al. Potential efficacy of imiquimod on immunity-related cytokines in murine skin *in vivo* and in human Langerhans cells *in vitro*. *Int J Dermatol*. 2012;51(9):1116-1122. doi:10.1111/j.1365-4632.2011.05382.x.
7. Смирнов В.В., Кудрявцева Т.А. Вартоцид (имиквимод). С-Петербург, изд-во "Типоокраг", 2017, 144 с.
8. Benck C, Martinov T, Fife B, et al. Isolation of Infiltrating Leukocytes from Mouse Skin Using Enzymatic Digest and Gradient Separation. *Immunology and Infection*. 2016;25(107):e53638. doi:10.3791/53638.

### Сведения об авторах

Сорокина Екатерина Вячеславовна – доктор медицинских наук, доцент, врач-дерматовенеролог, лаборатория механизмов регуляции иммунитета, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». E-mail: sorokina-cathrine@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-1188-6578; eLibrary SPIN: 1052-6474.

Бишева Ирина Васильевна – младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: ibisheva@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-8143-7356; eLibrary SPIN: 9846-1006.

Ахматова Элина Альтафовна – младший научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин, соискатель ученой степени кандидата медицинских наук лаборатории механизмов регуляции иммунитета, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: ela.150@ya.ru. ORCID: 0000-0002-9073-5291.

Столпникова Вера Николаевна – ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: stolpnikova@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-9363-2274; eLibrary SPIN-код: 4287-5853.

Сенцова Елизавета Юрьевна – врач-патологоанатом отделения онкопатологии, МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России; соискатель ученой степени кандидата медицинских наук лаборатории механизмов регуляции иммунитета, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: mail.elizaveta@mail.ru. ORCID: 0009-0002-2586-633X; eLibrary SPIN-код: 1750-6270.

Калининченко Евгений Олегович – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: gladius.domini@gmail.com. ORCID: 0000-0002-0048-3968; eLibrary SPIN-код: 9835-5120.

Поступила 18.04.2024.