

PRECLINICAL EVALUATION OF IMMUNOTROPIC ACTION OF PROBIOTICS BACILACT TRANSDERMAL THERAPEUTIC SYSTEM

Zabokritskiy N.A.

Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

The article is devoted to the study of immunotropic action developed bicomponent probiotic drug bacilact in a soft medicinal form (based on tizol, eftiderm and silicontitaniumorganical glycerohydrogel) on quantitative changes of parameters of cellular immunity in the treatment of localized infected wound animal skin, caused by *Staphylococcus aureus*. Thus, in particular, an increase in phagocytic activity of neutrophils of peripheral blood and peritoneal macrophages (average 2 times), increased the quantitative content of T- and B-lymphocytes (1.5-2 times). Studies to assess the immune status of experimental animals with localized purulent infection of the skin caused by *Staphylococcus aureus*, which treatment the subjects performed gel preparations, allows to make a conclusion about their pronounced immunomodulatory properties on parameters of cellular immunity. More significant effects observed for drugs on the basis of bacilact containing tizol and silicontitaniumorganical glycerohydrogel.

Key words: probiotic, bacilact, tizol, eftiderm, silicontitaniumorganical glycerohydrogel, immunotropic action, cell-mediated immunity

РОЛЬ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β 1-ГЛИКОПРОТЕИНА В РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ КЛЮЧЕВЫХ ЦИТОКИНОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ БАЛАНС Th1/Th2

Заморина С. А.^{1,3}, Литвинова Л. С.², Юрова К. А.²,
Хазиахматова О. Г.², Тимганова В. П.¹, Бочкова М. С.¹,
Храмцов П. В.³, Раев М. Б.^{1,3}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь; ²Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград; ³Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Изучали влияние трофобластического β 1-гликопротеина человека (ТБГ) на продукцию Th1/Th2-цитоклинов интактными мононуклеарными клетками и монокультурами CD4+ клеток в условиях *in vitro* методом проточной флуориметрии. Установлено, что ТБГ преимущественно подавляет продукцию Th1-цитоклинов (IFN- γ , TNF- α , IL-2) исследуемыми типами клеток, и разнонаправленно регулирует продукцию Th2-цитоклинов, снижая продукцию IL-9, IL-13, IL-6, но повышая уровень IL-5. В итоге, ТБГ формирует интегральный Th2-цитоклиновый профиль интактных периферических клеток иммунной системы.

Ключевые слова: трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ), беременность, Th1-цитоклины, Th2-цитоклины, лимфоциты, моноциты, CD4-лимфоциты

Введение. Иммунологические взаимоотношения в системе мать-плацента-плод направлены на формирование толерантности иммунной системы матери к полуаллогенному эмбриону. Одним из ключевых механизмов реализации иммунной толерантности является изменение

спектра продуцируемых цитоклинов, вследствие чего происходит переключение системных иммунных реакций в сторону гуморальных, регулируемых Т-хелперами 2 типа (так называемый феномен Th2-девиации) [1]. Нарушение адекватной перестройки цитоклино-

вого баланса может служить причиной осложнённого течения беременности [2].

Трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) является одним из фетоплацентарных белков, он синтезируется во время беременности клетками цито- и синцитиотрофобласта, а также при патологиях трофобласта злокачественного характера. В то же время, роль ТБГ в регуляции баланса Th1/Th2 на уровне клеток человека изучена недостаточно. Прежде всего, это связано с отсутствием в открытом доступе нативного (не рекомбинантного) препарата ТБГ человека. В Лаборатории экологической иммунологии (ИЭГМ УРО РАН, г. Пермь) разработана и запатентована авторская технология выделения и очистки ТБГ [3]. В настоящей работе мы изучили влияние ТБГ на продукцию основных цитокинов, определяющих девиацию Th1 (INF- γ , IL-2, TNF- α) /Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13) и, соответственно, приводящих к доминированию клеточного или гуморального звеньев иммунитета.

Целью работы являлась оценка роли ТБГ в регуляции продукции ключевых Th1/Th2 цитокинов периферическими мононуклеарными клетками и CD4⁺-лимфоцитами человека в системе *in vitro*.

Материал и методы. ТБГ человека получали авторским запатентованным методом [3]. В работе использовали физиологические концентрации ТБГ, соответствующие его уровню в периферической крови матери в динамике беременности: 1, 10 и 100 мкг/мл. Исследовали периферическую кровь небеременных женщин репродуктивного возраста (n=8). В эксперименте использовали суспензию мононуклеарных клеток, которые получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина. Методом позитивной иммуномагнитной сепарации с использованием набора ("InVitrogen", США) из суспензии мононуклеарных клеток изолировали CD4⁺-лимфоциты. Полученные клетки (мононуклеары (1*10⁷ кл/проба) и CD4⁺-лимфоциты (1*10⁶ кл/проба)) инкубировали с ТБГ в плоскодонном 24-луночном планшете в полной питательной среде (ППС) в течение 18 ч при 37°C и 5% CO₂ без дополнительных индукторов. Содержание ключевых Th1/Th2 цитокинов: IL2, IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL13, TNF- α , INF- γ определяли в инкубационной среде методом проточной флуориметрии («Luminex xMAP»). Метод представляет собой мультиплексную иммунную реакцию, про-

текающую на микрочастицах разного диаметра, на которых сорбированы соответствующие антитела, с их последующим проточным флуоресцентным анализом и одновременным определением концентрации исследуемых цитокинов. Процедуры осуществляли согласно протоколу "Bio-Plex Pro™ 27-Plex Assay". Результаты регистрировали с помощью автоматического фотометра для микропланшет Bio-Plex (Bio-Plex® 200 Systems, "Bio-Rad", США) и программы Bio-Plex Manager ("Bio-Rad"). Концентрацию исследуемых веществ определяли по стандартной калибровочной кривой каждого цитокина (динамический диапазон 2-32000 пг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного t критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Установлено, что при внесении в культуру интактных мононуклеарных клеток ТБГ (100 мкг/мл) снижал продукцию Th1-цитокинов – INF- γ и TNF- α , не влияя на уровень IL-2. На уровне монокультур интактных CD4⁺-лимфоцитов ТБГ (100, 10 мкг/мл) также оказывал достоверный супрессивный эффект на продукцию INF- γ и TNF- α , одновременно подавляя и продукцию IL-2. Очевидно, что в контексте беременности снижение уровня этих Th-1 цитокинов оказывает фетопротективный эффект.

В отношении Th2-цитокинов показано, что ТБГ не влиял на продукцию IL-4, IL-5, IL-10 мононуклеарными клетками. Одновременно, ТБГ подавлял продукцию IL-6, а в высокой концентрации оказывал супрессивный эффект на продукцию цитокинов IL9 и IL13. На уровне монокультур интактных CD4⁺-лимфоцитов ТБГ не влиял на продукцию IL-4, IL-10, IL-13, но в высоких концентрациях подавлял продукцию IL-6 и IL-9. В то же время, ТБГ (10 мкг/мл) стимулировал продукцию IL-5 интактными CD4⁺-лимфоцитами. Важно отметить, что IL-5 индуцирует дифференцировку В-лимфоцитов в иммуноглобулин-секретирующие клетки, что способствует формированию Th2-профиля. IL13, в свою очередь, стимулирует дифференцировку Т-клеток и продукцию антител, а IL9 ассоциирован с развитием аутоиммунных реакций, в связи с чем, снижение уровней этих цитокинов под влиянием ТБГ в контексте беременности играет очевидную роль в фетопротекции. В то же время, IL-6 является плеiotропным цитокином: с одной стороны, он

индуцирует эндокринную функцию плаценты и поддерживает Th2-поляризацию иммунного ответа интраэпителиальных лейкоцитов децидуальной оболочки, с другой стороны, IL-6 играет ключевую роль в развитии воспаления и иммунного ответа на инфекцию или повреждение тканей. Однако в целом, снижение его продукции под воздействием ТБГ можно отнести к противовоспалительным эффектам.

Таким образом, ТБГ оказывал преимущественно угнетающий эффект на продукцию провоспалительных цитокинов, подавляя генерацию Th1. За счет этого, интегральный цитокиновый профиль интактных периферических клеток иммунной системы под воздействием ТБГ формируется как противовоспалительный (Th2). В целом выявленные

эффекты можно интерпретировать как вклад ТБГ в формирование иммунологической толерантности при беременности.

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-04-00591, программой повышения конкурентоспособности (“дорожной карты”) и субсидией “Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7” БФУ им. И. Канта

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wegmann T. G., Lin T. H., Guilbert L., Mosmann T. R. // Immunol. Today. 1993. V.14, № 7. P. 353-356.
2. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. // Amer. J. Reprod. Immunol. 2010. V. 601. № 63. P. 601-610.
3. Раев М. Б. Способ выделения и очистки трофобластического β -1-гликопротеина. Патент РФ № 2367449 от 20.09.2009. / Раев М. Б. // «Изобретения. Полезные модели». 2009. № 26.

THE ROLE OF PREGNANCY-SPECIFIC GLYCOPROTEIN IN THE REGULATION OF PRODUCTION OF KEY CYTOKINES THAT DETERMINE BALANCE Th1 / Th2

Zamorina S. A.^{1,3}, Litvinova L. S.², Yurova K. A.²,
Khaziakhmatova O. G.², Timganova V. P.¹, Bochkova M. S.¹,
Khramtsov P. V.³, Rayev M. B.^{1,3}

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS; ²Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad; ³Perm State National Research University, Perm, Russia

The effect of pregnancy-specific glycoprotein (PSG) on the production of Th1/Th2-cytokines by intact mononuclear cells and monocultures of CD4 cells under *in vitro* conditions by flow-through fluorimetry was studied. It has been established that PSG predominantly suppresses the production of Th1-cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2) by the types of cells studied, and it regulates the production of Th2-cytokines in different directions, decreasing the production of IL-9, IL-13, IL-6, but increasing the level of IL-5. As a result, PSG forms the integral Th2-cytokine profile of intact peripheral cells of the immune system.

Key words: β 1-trofoblastic glycoprotein (TbG), pregnancy, Th1-cytokines, Th2-cytokines, lymphocytes, monocytes, CD4 lymphocytes