

## ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КОМПЛЕКСОМ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* OPRF И АТОХ

Калиниченко Е. О., Солдатенкова А. В., Калошин А. А.,  
Сходова С. А., Ахматова Н. К., Михайлова Н. А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток  
им. И. И. Мечникова», Москва, Россия

В настоящее время инфекции, вызываемые *Pseudomonas aeruginosa*, представляют собой важную проблему медицины. Их лечение крайне затруднено из-за широкой антибиотикорезистентности возбудителя. Цель. Изучить влияние иммунизации вакцинным препаратом против синегнойной инфекции на концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей. **Материалы и методы.** Мышам внутрибрюшинно вводили по 25 мкг OprF и 50 мкг анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Уровень цитокинов в сыворотках мышей после однократной иммунизации исследовали через 2, 4, 6 и 24 ч методом проточной цитометрии при помощи тест-системы FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex. **Результаты.** Выявлена динамика нарастания содержания цитокинов в сыворотках мышей: через 4 часа IL-1 $\alpha$ , IL-5; через 8 часов – IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, а также Th17/Th21/Th22 цитокинов – IL-17A и IL-22 и ИЛ-21; через 24 часа – IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . **Вывод.** Кандидатная вакцина против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox активирует как клеточное, так и гуморальное звено иммунной системы с индукцией Th1-, Th2- и Th17- ответа.

**Ключевые слова:** синегнойная палочка, рекомбинантные белки, цитокины

**Введение.** В настоящее время инфекции, вызываемые *Pseudomonas aeruginosa*, представляют собой важную проблему медицины. Их лечение крайне затруднено из-за широкой антибиотикорезистентности возбудителя, поэтому актуальным становится вопрос профилактики инфекции, прежде всего, у госпитализированных больных и у пациентов с муковисцидозом [1, 2]. В НИИВС им. И. И. Мечникова ведется разработка кандидатной вакцины против синегнойной инфекции на основе рекомбинантных белков OprF и aTox (делеционной атоксической формы экзотоксина A), сорбированных на гидроксиде алюминия [3].

**Цель.** Изучить влияние иммунизации вакцинным препаратом против синегнойной инфекции на концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей.

**Материалы и методы.** Препарат: рекомбинантные белки в дозах 25 мкг OprF и 50 мкг aTox, сорбированные на 75 мкг гидроксида алюминия (ФГУП «НПО Микроген» МЗ

РФ, Россия). Сорбцию проводили в течение 12 часов при температуре 4 °С, смешивая разведенные в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) антигены в равных весовых долях с гелем гидроксида алюминия. Вакцинный препарат вводили мышам-самкам линии BALB/c весом 14-16 г внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл.

Уровень цитокинов в сыворотках и супернатантах селезенки животных определяли на проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США) при помощи тест-системы FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex (eBioscience, США).

**Результаты.** Через 4 ч, 8 ч, 24 ч и 14 дней после иммунизации комплексом рекомбинантных OprF и анатоксина по десять мышей использовали для тотального забора крови с целью получения групповых пулов сыворотки крови. В качестве контрольной сыворотки использовали пул сывороток крови интактных животных.

Исследование цитокинового статуса мышей после иммунизации показало статистически значимое повышение уровней Th1/Th2/

Th17/Th21/Th22 цитокинов в сыворотках крови в разные сроки после введения.

Динамика Th-1 цитокинов у мышей имела волнообразный характер повышения спектра цитокинов с течением времени. Более ранний ответ выявлялся в отношении IL-1  $\alpha$  (повышение с 8,4 до 43,2 пкг/мл, (4 ч)  $p < 0,05$ ) и IL-1  $\beta$  (повышение с 2,43 до 32,47 пкг/мл, (8 ч)  $p < 0,05$ ). Затем происходило постепенное повышение концентраций TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-12p70, которые достигали своего максимума к концу суток (повышение, соответственно с 4,53 до 38,5 пкг/мл; с 1,4 до 15,23 пкг/мл и с 6,41 до 34,23 пкг/мл,  $p < 0,05$ ).

В унисон IL-1  $\alpha$  отмечался максимальный подъем уровня IL-5 через 4 часа после введения мышам антигенов *Pseudomonas aeruginosa* OpgF и aTox (с 4,26 до 12,27 пкг/мл,  $p < 0,05$ ), затем IL-4 (с 4,99 до 7,06 пкг/мл,  $p < 0,05$ ) и к концу суток определены максимальные уровни IL-6 и IL-10 (повышение, соответственно, с 3,42 до 18,43 пкг/мл и с 5,7 до 21,13 пкг/мл,  $p < 0,05$ ).

Что касается Th17/Th21/Th22 цитокинов, была выявлена положительная динамика с максимальным подъемом их уровней на 8 часов после иммунизации животных (с 19,33 до 4801 пкг/мл, IL-17A; с 0 до 17,13 пкг/мл; с 4,63 до 15,03 пкг/мл). При этом отмечалось повышение уровней IL-17A и IL-21 на все сроки наблюдения.

**Заключение.** Комплексный антигенный препарат уже на ранние сроки (4 ч) после введения вызывал значительное повышение секреции ряда цитокинов: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , стимулирующих синтез факторов острой фазы воспаления, пролиферацию лимфоцитов и лейкоцитов крови, IL-2, направляющего иммунный ответ по Th1-пути; вместе с тем, более значительно повышался синтез IL-5, индуцирующий Th2-иммунный ответ и стимулирующий дифференцировку В-лимфоцитов. Через 8 часов продолжалось накопление медиаторов острой фазы (IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ ), IL-2, IL-4 (вызы-

вающего дифференцировку Th0-лимфоцитов в Т-хелперы 2 типа) и IL-6, стимулирующего созревание В-лимфоцитов в плазмочиты. К 24 ч иммунный ответ характеризовался значительным повышением TNF $\alpha$ ; IFN $\gamma$ , IL-12 и IL-2, что свидетельствовало об активации Th1-иммунного ответа. Вместе с тем, нарастали уровни IL-6 и стимулятора Th2-ответа – IL-10. Также отмечено стимулирующее действие исследуемого препарата на уровни IL-17A, IL-21 и IL-22, ответственных за дифференцировку Th17 клеток, играющих важную роль в активации врожденного иммунитета и иммунной защиты слизистых оболочек [4].

Таким образом, исследования показали, что комплекс рекомбинантных белков синегнойной палочки OpgF и aTox активирует как клеточное, так и гуморальное звено иммунной системы с индукцией Th1-, Th2- и Th17- ответа, что открывает перспективы для создания вакцины на их основе.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2016 год.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Солдатенкова А. В., Гайдерова Л. А., Ахматова Н. К., Михайлова Н. А. Рекомбинантные белки *P. aeruginosa*: влияние на цитокиновый профиль мышей. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2013, 6, 80-87.
2. Rada B. Interactions between Neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. Pathogens. 2017, 6(1), 10.
3. Калошин А. А., Исаков М. А., Михайлова Н. А., Вертиев Ю. В. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012, 9, 330-335.
4. Hasan M., Neumann B., Hauptelshofer S., Stahlke S. Activation of TGF- $\beta$ -induced non-Smad signaling pathways during Th17 differentiation. Immunology & Cell Biology. Impact factor: 4.205, 2015.

## CYTOKINE PROFILE OF MICE IMMUNIZED BY COMPLEX OF RECOMBINANT OPRF AND ATOX ANTIGENS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Kalinichenko E. O., Soldatenkova A. V., Kaloshin A. V., Shotov S. A.,  
Akhmatova N. K., Mikhailova N. A.

*FGBNU Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia*

Currently, infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* are an important medical problem. Their treatment is extremely difficult because of the broad antibiotic resistance of the pathogen. **Objective:** to study the effect of immunization with a recombinant antigens of *Pseudomonas aeruginosa* on the concentration of cytokines in the serum of mice. **Materials and methods.** Mice were injected intraperitoneally with recombinant 25 µg OprF and 50 µg of toxoid. The cytokine responses of mice were monitored by using flow cytometry analysis at 2, 4, 6 and 24 hours after immunization («FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex»). **Results.** The dynamics of the cytokine levels in the sera of mice was revealed: after 4 hours IL-1α, IL-5; 8 hours later, IL-1β, IL-2, IL-4, and Th17/Th21/Th22 cytokines-IL-17A and IL-22 and IL-21; 24 hours later, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α and IFN-γ. **Conclusion.** Candidate vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* based on the recombinant proteins OprF and aTox activates both cellular and humoral immune system with induction of Th1, Th2 and Th17 responses.

*Key words:* *Pseudomonas aeruginosa*, recombinant proteins, cytokines

---

## РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФАКТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ОТНОШЕНИИ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ ШТАММОВ

Каримов И. Ф., Базарова Ю. Ю.

*ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия*

Молекулярные компоненты сыворотки крови оказывают неодинаковое влияние на различные группы бактерий. В работе использованы штаммы с двумя типами клеточной стенки и разными экологическими особенностями. Определена роль иммуноглобулинов и С5-белка системы комплемента в интенсивности развития бактерицидного эффекта в отношении люминесцирующих бактерий.

*Ключевые слова:* эффекторы иммунитета, антитела, комплемент, бактериальные биотесты, lux-гены

Различные молекулярные факторы сыворотки крови, в первую очередь белки и пептиды, выполняют различные функции, включая распознавание и разрушение чужеродных структур [1]. К этой группе можно отнести иммуноглобулины, белки системы комплемента, антимикробные пептиды, а также ряд ферментов, способствующих деградациии клеточных стенок бактерий [2]. При этом данные компоненты оказывают взаимное влияние друг на друга, обеспечивая более интенсивную активацию, что, к примеру, реализуется

посредством активации системы комплемента через белок С1 при наличии антител к антигенам патогена.

Возможностью использования люминесцирующих бактерий при оценке воздействия бактерицидных систем является сопряженность свечения, являющегося интегрированной частью метаболизма, и ростовой способности культуры [3]. В связи с этим, в работе по оценке активности сыворотки крови нами были использованы как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии, основ-