

*Е.М.Зайцев, А.В.Поддубиков, М.В.Брицина,
М.Н.Озерецковская, Н.У.Мерцалова, И.Г.Бажанова*

ПРОФИЛИ ЦИТОКИНОВ У МЫШЕЙ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ АКДС-ВАКЦИНОЙ С БЕСКЛЕТОЧНЫМ КОКЛЮШНЫМ КОМПОНЕНТОМ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Изучение цитокинового статуса мышей, иммунизированных вакцинами, содержащими бесклеточный коклюшный компонент. **Материалы и методы.** В работе использованы разработанные в НИИВС им. И.И.Мечникова бесклеточная коклюшная вакцина (БКВ) и адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина (АКБДС-вакцина), содержащие комплекс протективных антигенов коклюшного микроба. Мышей линии F₁ (СВА×С₅₇Bl₆) массой 12 — 14 г иммунизировали внутрибрюшинно 3-кратно с интервалом 7 дней БКВ и АКБДС-вакциной в прививочной дозе 0,5мл для человека, содержащей 25 мкг коклюшного компонента. В качестве контрольной группы использовали интактных мышей. Уровень цитокинов IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 определяли после каждой иммунизации в иммуноферментном анализе с использованием коммерческих тест-систем фирмы «Cusabio» (Китай). **Результаты.** В динамике иммунного ответа после введения БКВ и АКБДС-вакцины установлено повышение уровня цитокинов IFN-γ, IL-2, IL-5, IL-12 и отсутствие стимуляции продукции IL-4. **Заключение.** Полученные данные указывают на то, что иммунизация мышей БКВ и АКБДС-вакциной приводила к активации продукции цитокинов, характерных для иммунного ответа при коклюшной инфекции и иммунизации цельноклеточными АКДС-вакцинами.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 49—53

Ключевые слова: бесклеточная коклюшная вакцина, адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина с бесклеточным коклюшным компонентом, цитокины

*Е.М.Zaitsev, A.V.Poddubikov, M.V.Britsina,
M.N.Ozeretskovskaya, N.U.Mertsalova, I.G.Bazhanova*

PROFILES OF CYTOKINES IN MICE DURING IMMUNIZATION WITH ADTP-VACCINE WITH ACELLULAR PERTUSSIS COMPONENT

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Study cytokine status in mice immunized with vaccines containing acellular pertussis component. **Materials and methods.** Vaccines developed in Mechnikov RIVS — acellular pertussis vaccine (aPV) and adsorbed pertussis-diphtheria-tetanus vaccine (aDTaP), containing a complex of protective antigens of pertussis microbe — were used in the study. F₁ (CBA×C₅₇Bl₆) line mice weighing 12 — 14 g were immunized intraperitoneally 3 times at an interval of 7 days with aPV and aDTaP at human immunization dose (0.5 ml), containing 25 μg of pertussis component. Intact mice were used as a control group. Levels of IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 cytokines were determined after each immunization in enzyme immunoassay using commercial test-systems from Cusabio (China). **Results:** An increase of levels of IFN-γ, IL-2, IL-5, IL-12 and lack of stimulation of production of IL-4 was established in dynamics of immune response after administration of aPV and aDTaP vaccines. **Conclusion.** The data obtained indicate that immunization of mice with aPV and aDTaP vaccines resulted in activation of production of cytokines characteristic for immune response during pertussis infection and immunization with whole-cellular aDTP-vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 49—53

Key words: acellular pertussis vaccine, adsorbed pertussis-diphtheria-tetanus vaccine with acellular pertussis component, cytokines

ВВЕДЕНИЕ

Во многих странах мира, несмотря на широкий охват прививками населения, регистрируют подъем заболеваемости коклюшем, в том числе среди привитых детей, подростков и взрослых. Высоким остается уровень скрытой заболеваемости в виде малосимптомных и бессимптомных форм [14]. Цельноклеточная АКДС-вакцина достаточно эффективна, однако относительно высокая реактогенность ограничивает ее использование для проведения ревакцинации детей, подростков и взрослых. Высокая реактогенность цельноклеточной вакцины привела в большинстве развитых стран к переходу на менее реактогенные вакцины, содержащие бесклеточный коклюшный компонент, что позволило значительно повысить охват населения прививками и существенно снизить частоту поствакцинальных осложнений [6]. Однако в ряде стран, перешедших на БКВ, наблюдается рост заболеваемости коклюшем, в том числе среди привитых детей [3]. Есть основания считать, что БКВ менее эффективны, чем цельноклеточная вакцина, и формируют менее напряженный и длительный иммунитет [5, 12, 13]. Важное значение для формирования иммунитета к коклюшу имеет направленность цитокинового ответа. Имеются данные о том, что коклюшная инфекция и вакцинация цельноклеточными коклюшными вакцинами активируют продукцию цитокинов, отличающихся от цитокинов, продуцирующихся при иммунизации БКВ [6, 8, 9]. Создание коклюшных вакцин, сочетающих высокую иммуногенность с низкой реактогенностью, является актуальной задачей. В НИИВС им. И.И. Мечникова разработаны БКВ и АКБДС-вакцина на основе комплекса протективных антигенов коклюшного микроба. По специфической активности и безопасности препараты отвечают требованиям ВОЗ [2]. Изучение влияния БКВ и АКБДС на профили цитокинов имеет важное значение для понимания механизмов формирования иммунитета к коклюшу. Цель настоящей работы — исследование динамики продукции ряда цитокинов при иммунизации БКВ и АКБДС-вакциной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали разработанные в НИИВС им. И.И. Мечникова БКВ и АКБДС-вакцину. Мышей линии F₁ (CBA×C₅₇Bl₆) массой 12 — 14 г иммунизировали внутрибрюшинно 3-кратно с интервалом в 7 дней БКВ и АКБДС-вакциной, в прививочной дозе (0,5 мл) для человека, содержащими 25 мкг коклюшного компонента. В качестве контрольной группы использовали интактных мышей. Забор крови осуществляли под легким «оглушающим наркозом»: смесь двух частей эфира (для наркоза) с одной частью хлороформа (для наркоза). Уровень цитокинов IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 определяли через 2 часа после каждой иммунизации и затем на 7, 14, 21 и 28 сутки после последней иммунизации в иммуноферментном анализе с использованием коммерческих тест-систем фирмы «Cusabio» (Китай) в соответствии с инструкцией по применению. Измерение проводили при длине волны 450 nm на спектрофотометре Thermoscientific.

Мыши линии F₁ (CBA×C₅₇Bl₆) массой 12-14 г были получены из питомника НЦ биомедицинских технологий (филиал «Андреевка»). Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Количественные данные выражали как среднее арифметическое значение (M) со средней ошибкой среднего арифметического (m). Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Excel (Microsoft, США) с применением параметрических методов сравнения при нормальном распределении (t-критерий Стьюдента).

РЕЗУЛЬТАТЫ

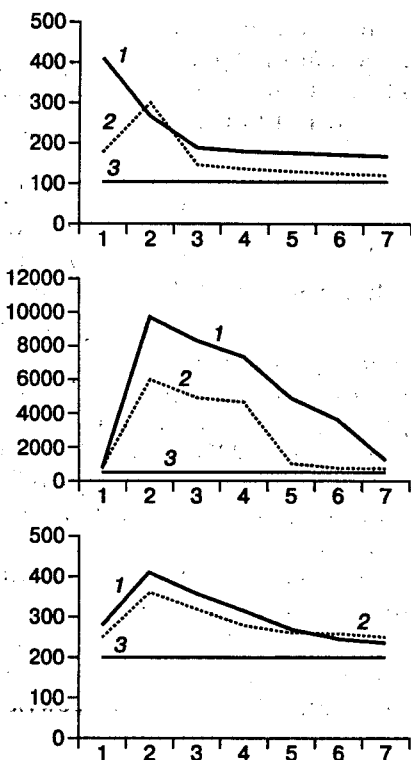
Исследована динамика продукции цитокинов IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IFN- γ у мышей при трехкратной иммунизации АКБДС-вакциной и БКВ. Выраженные изменения концентрации цитокинов выявлены в отношении IL-2, IL-5, IL-12 и IFN- γ .

Динамика продукции IL-2 характеризовалась достижением максимальных значений уже через 2 часа после первой иммунизации с последующим снижением в день второй иммунизации при статистически достоверных отличиях от контрольной группы. На все последующие сроки концентрация IL-2 в сыворотках иммунизированных мышей существенно не отличалась от показателей контрольной группы. У мышей, иммунизированных БКВ, концентрация IL-2 увеличивалась медленнее, достигая максимальных значений в день второй иммунизации с последующим снижением в день третьей иммунизации до уровня контрольной группы. При этом максимальный уровень IL-2 был несколько ниже, чем при иммунизации АКБДС-вакциной (рис., 1-й сверху).

Наиболее выраженными, по сравнению с контрольной группой, были изменения в концентрации IFN- γ . Резкое повышение уровня IFN- γ и достижение максимальных показателей было выявлено через 2 часа после второй иммунизации. Далее наблюдалось постепенное снижение концентрации IFN- γ при достоверных отличиях от контрольной группы до 21 дня после третьей иммунизации АКБДС-вакциной и до 14 дня после третьей иммунизации БКВ (рис., 2-й сверху).

У мышей, иммунизированных АКБДС-вакциной, концентрация IL-5 достигала максимальных значений в первый день после второй иммунизации с постепенным снижением до уровня контрольной группы. При иммунизации БКВ динамика IL-5 имела аналогичный характер (рис., 3-й сверху).

Концентрация IL-12 в сыворотках мышей контрольной группы составляла 70 ± 5 пг/мл. У иммунизированных мышей выраженное нарастание концентрации IL-12 выявлено в день второй иммунизации. Концентрация этого



Динамика IL-2 (рис. 1 сверху), IFN- γ (рис. 2 сверху), IL-5 (рис. 3 сверху).

По оси ординат — содержание цитокинов (пг/мл), по оси абсцисс — время после иммунизации: 1 — через 2 часа после первой, 2 — через 2 часа после второй, 3 — через 2 часа после третьей, 4, 5, 6 и 7 соответственно через 7, 14, 21 и 28 дней после третьей. 1 — АКБДС, 2 — БКВ, 3 — контроль.

интерлейкина у мышей, иммунизированных АКБДС-вакциной и БКВ, составляла 140 ± 8 пг/мл. В день третьей иммунизации уровень IL-12 составлял 110 ± 7 пг/мл, а на все последующие сроки исследования существенно не отличался от показателей контрольной группы.

Показано отсутствие стимуляции продукции цитокина IL-4 на всех этапах иммунизации БКВ и АКБДС-вакциной, поскольку уровень IL-4 у иммунизированных мышей составлял $8 \pm 0,7$ — $14 \pm 0,9$ пг/мл, а в контрольной группе — $10 \pm 0,5$ пг/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что иммунизация мышей БКВ и АКБДС-вакциной приводила к значимому повышению концентрации цитокинов IL-2, IL-5, IL-12, IFN- γ . В целом, динамика уровня этих цитокинов носила аналогичный характер и характеризовалась нарастанием с достижением максимальных значений и последующим снижением до уровня контрольной группы. Вместе с тем, выявлены определенные особенности динамики уровня отдельных цитокинов по срокам нарастания и достижения максимальных значений. Наиболее быстро активировалась продукция IL-2 — достоверно высокий уровень был зарегистрирован уже в первый день после первой иммунизации АКБДС-вакциной. При иммунизации БКВ уровень IL-2 достоверно отличался от контрольной группы в день после первой иммунизации, однако максимальные значения были выявлены в день второй иммунизации. Полученные данные указывают на активацию синтеза IL-2 после первичной антигенной стимуляции. Динамика IL-5, IL-12 и IFN- γ характеризовалась наибольшими показателями в день второй иммунизации, что указывает на стимуляцию синтеза этих цитокинов в результате первой и второй иммунизаций. Третья иммунизация не приводила к дополнительной стимуляции продукции этих цитокинов. Цитокиновый ответ на введение БКВ и АКБДС-вакцину носил аналогичный характер, однако концентрация цитокинов была несколько выше у мышей, иммунизированных АКБДС-вакциной. Это обстоятельство может быть обусловлено дополнительной стимуляцией цитокинового ответа дифтерийным и столбнячным анатоксинами, входящими в состав АКБДС-вакцины.

Таким образом, изучая динамику иммунного ответа мышей на БКВ и АКБДС-вакцину, мы выявили достоверное нарастание уровня цитокинов IFN- γ , IL-2, IL-5 и IL-12 при отсутствии стимуляции продукции IL-4. В формировании защиты от коклюшной инфекции важное значение имеет активация клеточного звена иммунитета, ассоциированная с продукцией определенного набора цитокинов. По литературным данным [6, 8, 9] при коклюшной инфекции и иммунизации цельноклеточными АКДС-вакцинами стимулируется преимущественно продукция цитокинов IFN- γ , IL-2 и IL-12, что обеспечивает формирование оптимального протективного ответа. Напротив, при иммунизации БКВ преимущественно активируется продукция цитокинов IL-4 и IL-5 при отсутствии или низком уровне продукции IFN- γ , IL-2 и IL-12. С этим типом цитокинового ответа связывают менее выраженную, по сравнению с цельноклеточными вакцинами, иммуногенность БКВ [4, 7, 8]. Предполагается, что создание БКВ нового поколения, стимулирующих продукцию набора цитокинов, характерных для коклюшной инфекции, позволит существенно повысить эффективность вакцинопрофилактики коклюша [10, 11]. Учитывая все эти данные, можно предположить, что преобладание при

иммунизации мышей разработанной нами АКБДС-вакциной продукции цитокинов, характерных для коклюшной инфекции, свидетельствует о ее высокой защитной активности на фоне низких токсических и сенсибилизирующих свойств, что было показано нами при проведении доклинических исследований [1, 2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцев Е.М., Брицина М.В., Бажанова И.Г. и др. Доклинические исследования адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины (АКДС-вакцины) с бесклеточным коклюшным компонентом. Журн. микробиол. 2013, 6: 43-49.
2. Захарова Н.С., Брицина М.В., Мерцалова Н.У. и др. Отечественная бесклеточная коклюшная вакцина. Журн. микробиол. 2008, 1: 35-41.
3. Allen A.C., Mills K.H. Improved pertussis vaccines based on adjuvants that induce cell-mediated immunity. Expert Rev. Vaccines. 2014, 13 (10): 1253-1264.
4. Ausiello C.M., Urbani F., la Sala A. et al. Vaccine and antigen — dependent type 1 and 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole — cell or acellular pertussis vaccines. Infect. Immun. 1997, 65 (6): 2168-2174.
5. Brummelman J., Wilk M.M., Han W.G. et al. Roads to the development of improved pertussis vaccines paved by immunology. Pathog. Dis. 2015, 73 (8): ftv067.
6. Higgs R., Higgins S.C., Ross P.J. et al. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. Mucosal Immunol. 2012, 5: 485-500.
7. Mahon B.P., Ryan M.S., Griffin F. et al. Interleukin 12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhance the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. Infect. Immun. 1996, 64 (12): 5295-5301.
8. McQuirk P., Mills K.H. A regulatory role for interleukin 4 in differential inflammatory responses in the lung following infection of mice primed with Th1 or Th2 — inducing pertussis vaccines. Infect. Immunol. 2000, 68 (3): 1383-1390.
9. Ryan M., Gotherfors L., Storsaeter J. et al. *Bordetella pertussis* — specific Th1/Th2 cell generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: comparison of the T cell cytokine profiles in infants and mice. Dev. Biol. Stand. 1997, 89: 297-305.
10. Ryan M., Murphy G., Ryan E. et al. Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. Immunology. 1998, 93 (1): 1-10.
11. Ross P.J., Sutton C.E., Higgins S. et al. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular vaccine. PLoS Pathog. 2013, 9 (4): e1003264.
12. Smallridge W.E., Rolin O.Y., Jacobs N.T. et al. Different effects of whole cell and acellular vaccines on *Bordetella* transmission. J. Infect. Dis. 2014, 209 (15): 1981-1988.
13. Smits K., Pottier G., Smet J. et al. Different T cell memory in preadolescents after whole-cell or acellular pertussis vaccination. Vaccine. 2013, 32 (1): 111-118.
14. Souder E., Long S.S. Pertussis in the era of new strains of *Bordetella pertussis*. Infect. Dis. Clin. North. Am. 2015, 29 (4): 699-713.

Поступила 23.06.16

Контактная информация: Зайцев Евгений Михайлович, д.м.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер, 5а, р.т.(495)916-22-63