

УДК 612.017.1:612.112.31

Иммуномакс – агонист TLR4 – влияет на фенотип легочных макрофагов при респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у мышей

А. А. Никонова^{1,2*}, А. В. Пичугин¹, М. М. Чулкина¹, Е. С. Лебедева¹, А. Р. Гайсина¹,
И. П. Шиловский¹, Р. И. Атауллаханов¹, М. Р. Хаитов¹, Р. М. Хаитов¹

¹Государственный научный центр Институт иммунологии ФМБА России, 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А

*E-mail: aa.nikonova@nrcii.ru

Поступила в редакцию 06.10.2018

Принята к печати 08.11.2018

РЕФЕРАТ В экспериментах *in vitro* и *in vivo* изучено действие Иммуномакса – агониста TLR4 растительного происхождения. В частности, с использованием культуры макрофагов, выделенных из костного мозга мышей, показано, что Иммуномакс переводит макрофаги мыши из состояния M0 и M2 в M1 (для определения фенотипа использовали данные об экспрессии мРНК генов *ARG1* и *iNOS*). Профилактическое (противовирусное) действие Иммуномакса изучено как на модели инфекции мышей респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ), так и на модели обострения бронхиальной астмы на фоне РСВ-инфекции. В эксперименте с вирусиндуцированным обострением бронхиальной астмы выявили достоверное снижение вирусной нагрузки в гомогенатах легких мышей, обработанных Иммуномаксом, а также тенденцию к снижению уровня Th2-зависимых овальбуминспецифических IgG1-антител в сыворотке крови, преобладание M1-фенотипа макрофагов в легких, повышение РСВ-активированных CD4⁺ Т-клеток, содержащих внутриклеточный IFN- γ (Th1-клетки), и одновременно значительное снижение CD4⁺ клеток, секретирующих внутриклеточный IL-4 (Th2-клетки), определенных в селезенках мышей методом ELISPOT через 1,5 месяца после окончания эксперимента. Эти данные свидетельствуют о том, что применение Иммуномакса поляризует иммунный ответ в сторону Th1 и, по-видимому, может быть использовано в качестве средства для профилактики РСВ-инфекции на фоне иммунного ответа аллергического типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бронхиальная астма, респираторно-синцитиальный вирус, макрофаги, PRR, агонист TLR4.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БА – бронхиальная астма; ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции; IL – интерлейкин; РСВ – респираторно-синцитиальный вирус; TLR – Toll-подобные рецепторы; Мф – макрофаги; IFN – интерферон; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени; аМф – альвеолярные Мф.

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма (БА) – это заболевание, в основе которого лежит хроническое воспаление дыхательных путей. Воспаление, обуславливающее гиперреактивность бронхов, развивается под влиянием Т-хелперов второго типа (Th2-ответ). За последние 15–20 лет заболеваемость БА среди населения Российской Федерации выросла более чем в 3 раза и составила 902,8 на 100000 населения (2007 г.). Обострения БА у детей и взрослых в большинстве случаев ассоциированы с острыми респираторными

вирусными инфекциями (ОРВИ). Некоторые виды вирусов, такие, как респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), риновирусы, метапневмовирус, вирусы гриппа, парагриппа и коронавирусы, детектированы в секретах дыхательных путей в период обострения БА [1]. В связи с этим разработка новых средств профилактики ОРВИ является важной проблемой системы здравоохранения.

Альвеолярные Мф (аМф) – доминантная популяция клеток бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), отличаются способностью приобретать разнообраз-

ные фенотипы в зависимости от сигналов микроокружения (классически активированные M1, альтернативно активированные M2). Регуляторную роль различных фенотипов Мф *in vivo* активно изучают, но накапливаются данные, свидетельствующие о том, что Мф могут участвовать в патогенезе БА [2, 3].

Среди рецепторов распознавания молекулярных образов патогенов (pathogen pattern recognition receptors, PRR) наиболее изучены Toll-подобные рецепторы (TLR), активация которых необходима для запуска механизмов врожденного иммунного ответа на инфекцию. В связи с этим считается, что агонисты TLR могут использоваться в качестве иммунотерапевтических препаратов или адъювантов вакцин для лечения инфекционных заболеваний. Выделенный из проростков картофеля [4] TLR4-агонист Иммуномакс эффективен в отношении целого ряда патогенов как вирусной (папилломавирус, герпесвирус), так и бактериальной природы, а также обладает потенциальной противоопухолевой активностью [5]. Ранее сообщалось, что иммуномодулятор Иммуномакс активирует моноциты, Мф, NK и дендритные клетки [6].

В данной работе изучена роль M2 Мф при воспалении БА, индуцированной вирусными инфекциями, а также возможность искусственного изменения поляризации Мф из M2 в M1 с помощью агонистов TLR с целью повышения эффективности иммунной защиты от РСВ на фоне иммунного ответа аллергического типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поляризация макрофагов мыши посредством препарата Иммуномакс в экспериментах *in vitro*

Макрофаги (Мф), выделенные из костного мозга мыши, помещали в 24-луночные планшеты в концентрации 10^5 клеток на лунку и в течение 7 дней культивировали в среде, содержащей гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Через 7 дней клетки в течение 24 ч обрабатывали IL-4 для получения M2 Мф, Иммуномаксом – для получения M1 или питательной средой для M0. Через 24 ч после обработки IL-4 среду заменяли на новую с Иммуномаксом для реполяризации M2 в M1, а также добавляли Иммуномакс в M0 для реполяризации в M1. Схема эксперимента представлена на рис. 1А. Через 24 ч после обработки лизаты клеток отбирали, замораживали при -80°C и хранили до момента исследования. Далее образцы анализировали методом ПЦР-РВ, определяя при этом уровень мРНК генов *iNOS* и *ARG1* мыши.

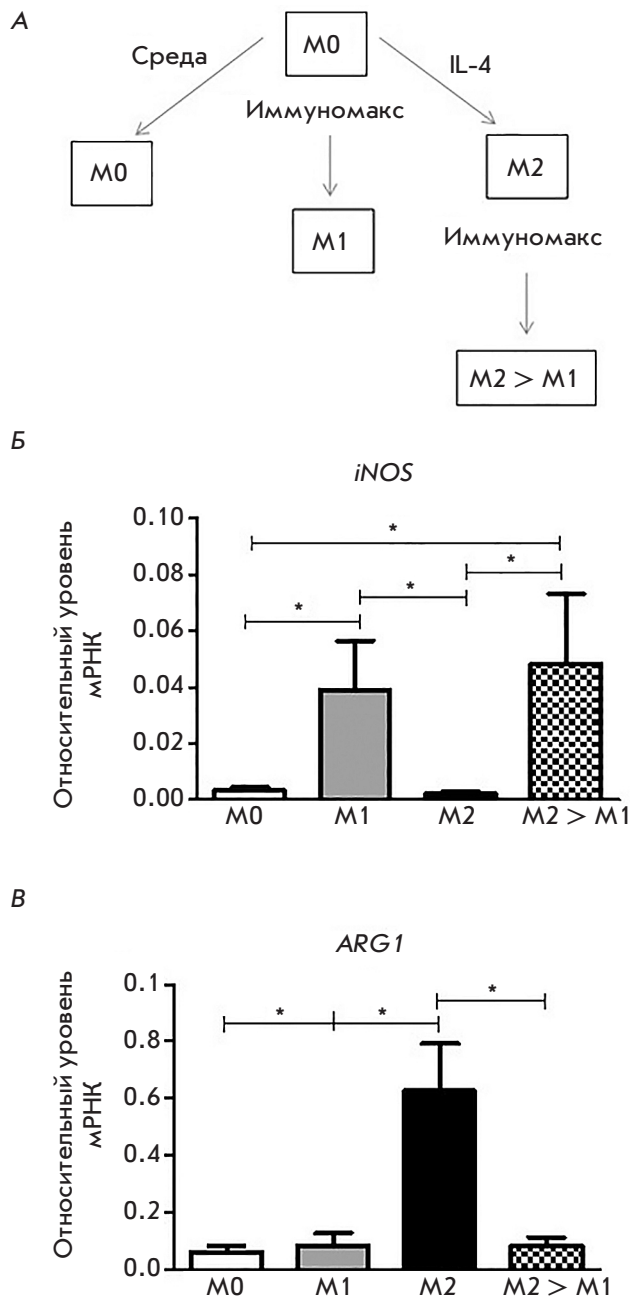


Рис. 1. TLR4-агонист Иммуномакс поляризует макрофаги мыши в M1-фенотип в условиях *in vitro*. А – дизайн эксперимента; уровень экспрессии мРНК *iNOS* (Б) и *ARG1* (В), оцененный методом ПЦР-РВ и нормированный по уровню мРНК бета-актина

Эксперименты в условиях *in vivo*

Профилактический эффект Иммуномакса *in vivo* мы оценивали на двух экспериментальных моделях: РСВ-инфекции у мышей и вирус-индуцированного обострения БА у мышей. Схема экспериментов представлена на рис. 2А и 2Б соответственно. В ка-

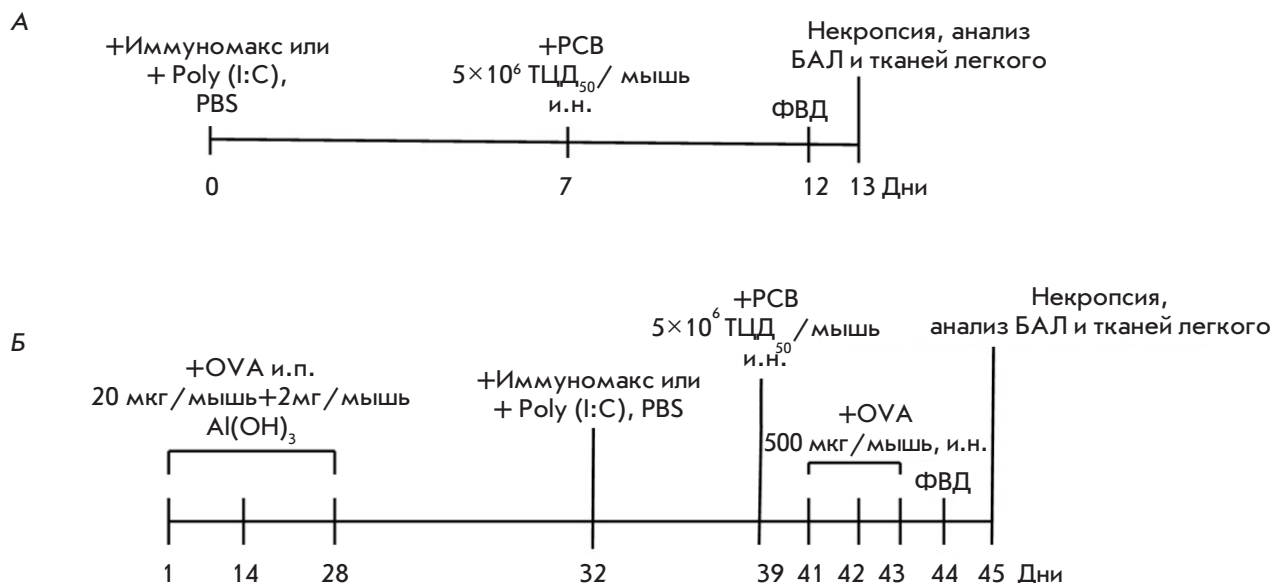


Рис.2. Схема экспериментов *in vivo*. А – модель РСВ-инфекции на мышах, Б – модель обострения бронхиальной астмы (БА) на фоне РСВ-инфекции у мышей. PBS – фосфатно-солевой буфер, и.н. – интраназальное введение, ФВД – оценка функции внешнего дыхания, OVA – овалбумин, и.п. – интраперитонеальное введение, БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж. Были сформированы следующие экспериментальные группы животных (на модели РСВ-инфекции): 1) РСВ+Иммуномакс ($N = 17$); 2) РСВ+Poly (I:C) ($N = 17$); 3) РСВ ($N = 17$); 4) интактные мыши ($N = 17$). На модели обострения БА на фоне РСВ-инфекции: 1) БА/РСВ+Иммуномакс ($N = 17$); 2) БА/РСВ+Poly (I:C) ($N = 17$); 3) БА/РСВ ($N = 17$); 4) интактные мыши ($N = 17$)

честве вирусного агента был выбран РСВ штамм А2. В экспериментах использовали самок мышей линии BALB/c массой 18–20 г из питомника «Столбовая», Россия.

В экспериментах были сформированы по четыре группы животных ($N = 17$) (рис. 2). По восемь мышей из каждой группы использовали для гистологического исследования и ПЦР-анализа. Часть мышей ($N = 4$) использовали для анализа фенотипов популяций макрофагов в легких (посредством комплексного клеточного анализа бронхиального лаважа и клеточного инфильтрата легких с помощью многопараметровой проточной цитометрии). Четырех мышей из каждой группы использовали для идентификации количества РСВ-специфических CD4⁺ Т-клеток, секретирующих IFN- γ и IL-4, методом ELISPOT через 1.5 месяца после инфекции.

На основании работы Misharin и соавт. [7] для идентификации популяций клеток миелоидного ряда мы выбрали следующее сочетание антител – CD11b Brilliant Violet 510[™], CD45 AlexaFluor®, Ly-6C PE, CD11cPE/Dazzle[™] 594, CD49bPerCP/Cy5.5, Ly-6GPE/Cy7, F4/80APC, I-A/I-EAPC/Cy7. Для сортировки клеток использовали проточный цитометр FACS Aria II. Экспрессию мРНК генов *iNOS* и *ARG1* в отсортированных Мф оценивали методом ПЦР-РВ.

С целью оценки противовирусного эффекта агонистов TLR методом ПЦР-РВ определяли уровень РНК РСВ в лизатах клеток, выделенных из гомогенатов легких.

Для идентификации секретирующих IFN- γ и IL-4 РСВ-специфических CD4⁺ Т-клеток использовали коммерческие наборы Mouse IL-4 ELISPOT Set и Mouse IFN- γ ELISPOT Kit (BD Biosciences, США) согласно инструкции производителя.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism version 4.0. Данные считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы изучали возможность Иммуномакса, агониста TLR4, переводить макрофаги мыши из состояния M0 и M2 в M1. Фенотип Мф определяли, используя информацию об экспрессии мРНК генов *iNOS* и *ARG1* – маркеров M1- и M2-фенотипов соответственно [8]. Полученные нами данные подтверждают способность Иммуномакса реполяризовать клетки в состояние M1. В частности, в обработанных Иммуномаксом M0 повышается экспрессия *iNOS* и снижается экспрессия *ARG1*. Такой же эффект мы наблюдали в M2-клетках, обработанных Иммуномаксом (повы-

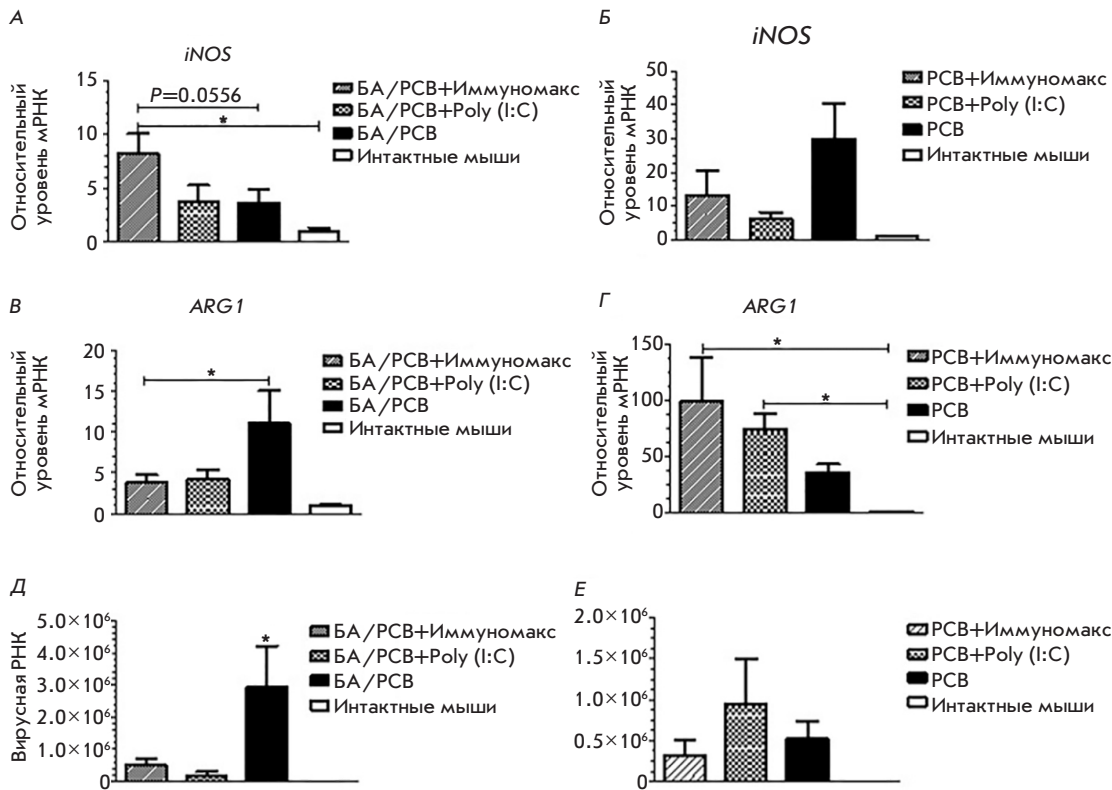


Рис. 3. Экспрессия мРНК *iNOS* (А, Б) и *ARG1* (В, Г) в альвеолярных макрофагах мыши. Д, Е – количество вирусной РНК РСВ на 1 г легочной ткани мышей, определенное методом ПЦР-РВ. А, В, Д – модель обострения бронхиальной астмы (БА) на фоне РСВ-инфекции у мышей. Б, Г, Е – модель РСВ-инфекции на мышах

шение уровня мРНК гена *iNOS* и снижение *ARG1* (рис. 1Б, В)).

На следующем этапе мы перешли к изучению *in vivo* профилактического эффекта от применения Иммуномакса как в экспериментах с РСВ-инфекцией у мышей, так и с обострением БА на фоне РСВ-инфекции (рис. 2). В этой серии мы оценивали целый ряд параметров, таких, как функция дыхания, клеточный состав БАЛ, гистологические изменения, уровень сывороточных овальбуминспецифических антител разных классов (IgE, IgG1 и IgG2). Не выявлено статистически значимых различий в величинах этих показателей у животных экспериментальных групп (данные не представлены).

Однако следует отметить, что в эксперименте с БА+РСВ мы выявили тенденцию к снижению уровня овальбуминспецифических IgG1-антител в сыворотке крови мышей, получавших Иммуномакс (данные не представлены). Классическим носителем свойств антител являются Th2-зависимые IgG1-антитела, содержание которых может увеличиваться при аллергических заболеваниях. Снижение под воздействием Иммуномакса уровня IgG1-антител, наблюдаемое в нашем исследовании, по всей видимости, свидетельствует о развитии иммунных реакций по Th1-типу. Интересно, что эти реакции наблюда-

ются на системном уровне, несмотря на интраназальное введение препарата.

Особый интерес представлял фенотип легочных Мф мышей в разных условиях эксперимента, так как мы предполагаем, что при интраназальном введении Иммуномакс действует на клетки этого типа, переводя их в состояние М1. Чтобы проверить эту гипотезу, мы выделяли Мф из легких посредством сортировки на проточном цитометре FACSaria II и оценивали экспрессию мРНК генов *iNOS* и *ARG1*. При анализе данных ПЦР-РВ мы отметили тенденцию к повышению уровня *iNOS* (рис. 3А) и значимое снижение уровня *ARG1* (рис. 3В) в Мф мышей с БА, обработанных Иммуномаксом, на фоне РСВ-инфекции. Это указывает на поляризацию Мф в противовирусное М1-состояние. Однако в эксперименте с РСВ-инфекцией у мышей подобной тенденции не выявлено (рис. 3Б,Г).

При оценке вирусной нагрузки отмечено статистически значимое снижение количества вирусной РНК в легких мышей, обработанных Иммуномаксом, по сравнению с группой животных, не получавших лечение (рис. 3Д). Отмечена также тенденция к снижению вирусной нагрузки в группе, обработанной Poly (I : C) – агонистом TLR3. Эти данные получены в эксперименте с вирус-индуцированным обостре-

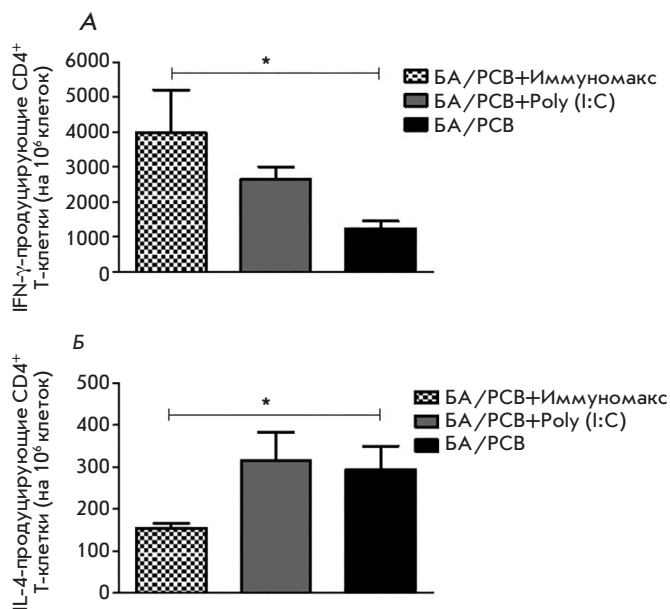


Рис. 4. Количество IFN-γ (А) и IL-4 (Б) продуцирующих CD4⁺ Т-клеток в селезенках мышей с моделируемым обострением бронхиальной астмы на фоне РСВ-инфекции. Количество РСВ-специфических CD4⁺ Т-клеток определяли методом ELISPOT (некропсию мышей проводили через 1.5 месяца после окончания эксперимента)

нием БА. Мы выявили также тенденцию к снижению вирусной нагрузки у мышей с РСВ-инфекцией, получавших исследуемый препарат (рис. 3Е).

На рис. 4 представлены результаты выявления РСВ-специфической дифференцировки Th1- и Th2-клеток методом ELISPOT. В эксперименте с моделированием обострения БА на фоне РСВ-инфекции мы наблюдали значимое повышение РСВ-активированных CD4⁺ Т-клеток, секретиру-

ющих IFN-γ (Th1-клетки) (рис. 4А), и одновременно значительное снижение содержания CD4⁺ клеток, секретирующих IL-4 (Th2-клетки) (рис. 4Б) в селезенках мышей, обработанных Иммуномаксом. У мышей с РСВ-инфекцией, обработанных Иммуномаксом, выявлена тенденция к повышению содержания активированных CD4⁺ Т-клеток, секретирующих IFN-γ (Th1-клеток), при этом не обнаружено CD4⁺ клеток, секретирующих IL-4 (Th2-клетки) (данные не представлены).

Таким образом, в ходе экспериментов *in vitro* и *in vivo* показано, что агонист TLR4 Иммуномакс способен реполяризовать Th2-ответ в противовирусный Th1. Эффект от применения Иммуномакса наблюдали на модели БА, осложненной РСВ-инфекцией, где у мышей изначально посредством сенсibilизации модельным аллергеном овалбумином формировали выраженный Th2-ответ. Главной концепцией в терапии аллергических заболеваний является инверсия иммунного Th2-ответа в сторону Th1. Этот подход особенно актуален при ОРВИ у пациентов с БА, так как многочисленные данные свидетельствуют от том, что пациенты с БА переносят ОРВИ в более тяжелой форме [9]. Это связывают с доминирующим Th2-ответом, который, возможно, вызван преобладанием в легких больных активированных M2 Мф [3]. В связи с этим, полученные нами данные свидетельствуют о том, что обработка Иммуномаксом, агонистом TLR4, оказывает влияние на фенотип легочных Мф, поляризуя иммунный ответ в сторону Th1, и поэтому обладает потенциалом для использования в качестве средства для профилактики РСВ-инфекции, в том числе на фоне аллергического типа иммунного ответа. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-10188).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Царев С.В., Хаитов М.Р. // Рос. мед. журн. 2009. № 2. С. 136–139.
- Никонова А.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. // Мед. иммунология. 2017. Т. 9. № 6. С. 657–672.
- Melgert B.N., ten Hacken N.H., Rutgers B., Timens W., Postma D.S., Hylkema M.N. // J. Allergy Clin. Immunol. 2011. V. 127. № 3. P. 831–833.
- Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В., Мельникова Т.М., Хаитов Р.М. Патент, RU2013151824А, Россия, А61Р 37/02, 2013.
- Ghochikyan A., Pichugin A., Bagaev A., Davtyan A., Novakimyan A., Tukhvatulin A., Davtyan H., Shcheblyakov D., Logunov D., Chulkina M., et al. // J. Transl. Med. 2014. V. 29. № 12. P. 322.
- Bagaev A., Pichugin A., Nelson E.L., Agadjanyan M.G., Ghochikyan A., Ataullakhanov R.I. // J. Immunol. 2018. V. 200. № 8. P. 2656–2669.
- Misharin A.V., Morales-Nebreda L., Mutlu G.M., Budinger G.R., Perlman H. // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2013. V. 49. № 4. P. 503–510.
- Murray P.J., Wynn T.A. // J. Leukoc. Biol. 2011. V. 89. № 4. P. 557–563.
- Corne J.M., Marshall C., Smith S., Schreiber J., Sanderson G., Holgate S.T., Johnston S.L. // Lancet. 2002. V. 359. № 9309. P. 831–834.