

ИММУНОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО КОЛИЦИНА E2 НА МОДЕЛИ ПНЕВМОНИИ ВИРУСНОГО ГЕНЕЗА У БЕЛЫХ МЫШЕЙ

М.А. Азямов, канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник

Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого (Россия, г. Киров)

DOI:10.24412/2500-1000-2022-11-1-7-12

Аннотация. Цель исследования – изучение иммунопротективного действия рекомбинантного колицина E2 (Res ColE2) на модели пневмонии вирусного генеза у белых мышей. Были сформированы три группы нелинейных белых мышей. Первая (контрольная) интактная, мышам второй (подопытной) группы вводили интраназально по 50 мкл полинозиную-полицитидиловую кислоту и через 24 часа 50 мкл (на мышь) вирусосодержащий раствор аденовируса 2 типа крупного рогатого скота. Животных третьей группы, после введения заражающих агентов, подвергали курсу внутривентральных инъекций Res ColE2 в дозе 0,1 мл (100 мг) на голову один раз в сутки в течение 8 дней. На 11-ые сутки мышей декапитировали. Методом проточной цитометрии проводили иммунофенотипирование T-лимфоцитов в крови. Методом иммуноферментного анализа определяли цитокины, дефензины и сурфактантный белок A. Во второй группе отмечали возрастание в крови T-лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD25⁺, а также количество интерлейкина1 β (IL-1β), интерлейкина-2 (IL-2), интерферона-гамма (IFN-γ), фактора некроза опухолей (TNF-α), сурфактантного белка A (SP-A), дефензинов α1 и β1 (DEFα1, DEFβ1).

Получены достоверные данные о выраженном иммунопротективном действии Res ColE2 на клеточный иммунитет белых мышей. Установлено, что препарат снижал уровень CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD25⁺ в крови животных до физиологического и нормализовал количественные показатели IL-1β, IL-2, IFN-γ, TNF-α, DEFα1, DEFβ1 и SP-A.

Ключевые слова: аденовирус 2 типа, белые мыши, дефензины, иммунофенотипирование, клеточный иммунитет, метод проточной цитометрии, рекомбинантный колицин E2, T-лимфоциты, цитокины.

Антропогенное воздействие на экологию планеты приводит к ускорению изменения генома вирусов. Такая ситуация создает угрозу возникновения сложно-контролируемых эпидемических и эпизоотических процессов.

Возбудители аденовирусной инфекции обладают высокой скоростью репликации, выраженной латенцией, способностью связываться с белками крови, что ведет к угнетению гуморального и клеточного иммунитета и достоверно подтверждается высокими показателями заболеваемости людей и животных при мониторинге вирусных заболеваний [1, 2].

Аденовирусы, в силу своего филогенетического развития, обладают высокой устойчивостью к химическим детергентам и длительно сохраняются во внешней среде [3]. Широкое применение в лечебной практике синтезированных лекарственных

препаратов вызывает появление резистентных вариантов аденовирусов, обусловленных изменениями тиамидинкиназы и ДНК-полимеразы пораженных клеток [4].

Некоторые варианты аденовирусов все чаще приобретают устойчивость к интерферонам путем генной мутации или ингибированием передачи сигналов интерферона после связывания его с рецептором [5].

Большинство противовирусных препаратов, несмотря на достаточно высокую терапевтическую эффективность обладают нефротоксичностью, гепатотоксичностью, кардиоваскулярной токсичностью и другим побочным действием [6].

В связи с этим, изучение новых препаратов для снижения репликации аденовирусов и исследование ответных реакций иммунитета на моделях *in vivo* может по-

мочь в объяснении некоторых аспектов иммунопатогенеза аденовирусных инфекций.

Целью работы являлось изучение иммунопротективного действия рекомбинантного колицина E2 (патент №2188233 от 2708.2002, ТУ 9337-010-00008064-01) на модели пневмонии вирусного генеза у белых мышей.

Материалы и методы

Иммунопротективное действие рекомбинантного колицина E2 (Rec ColE2) исследовали на модели пневмонии вирусного генеза у белых мышей.

Были сформированы три группы из нелинейных белых мышей-самцов с массой тела $25,0 \pm 1,0$ г по 10 животных в каждой группе. Животных содержали при естественном режиме освещения и свободном доступе к воде и пище. Эксперименты выполняли в соответствии с международными рекомендациями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследований, от 18 марта 1986 года. Мыши первой (контрольной) интактной группы не подвергались манипуляциям. Животным второй и третьей (подопытных) групп интраназально вводили по 50 мкл на мышью раствора натриевой соли (20 мкг/мл) полиинозиновой-полицитидиловой кислоты (Poly I:C), как индуктор воспаления вирусного генеза, способствующий возможности заражения мышью аденовирусом второго типа крупного рогатого скота. Через сутки мышам вышеуказанных групп интраназально в дозе 50 мкл на животное вводили вирусосодержащую суспензию аденовируса второго типа крупного рогатого скота, выделенного из экссудата носовой полости больного телёнка. Вирусосодержащая суспензия с инфекционной активностью $6,5 \text{ LgTCID}_{50/\text{мл}}$ на культуре клеток MDBK (Madin Darby Bull Kidney) в дозе 50 мкл составляла 5LD_{50} для беспородных белых мышей в присутствии полиинозиновой-полицитидиловой кислоты.

Через 24 часа после введения аденовируса второго типа (Adv2) животным третьей (подопытной) группы вводили Rec ColE2 внутрибрюшинно в дозе 0,1 мл

(100 мкг Rec ColE2) один раз в сутки в течение 8 суток.

Наблюдение за белыми мышами осуществляли в течение 10 суток. Гибели среди переболевших мышей подопытных групп не отмечали.

После 10 суток мышам всех трех групп усыпляли декапитацией с взятием крови от каждого животного. Эритроциты в исследуемых пробах крови удаляли раствором BD FASK Lysin solution с последующим трехразовым отмыванием. Для иммунофенотипирования T-лимфоцитов использовали моноклональные антитела меченые флюоресцеинизотиоцианатом к CD4 и CD85 (Caltag Inoitrogen) и к CD3, CD8 – фикоэритрином (BD Biosciences Farmingen). Содержание субпопуляций T-лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии на проточном цитометре Facs Calibur (Becton Dickinson).

Количество цитокинов – интерлейкина- 1β (IL- 1β), интерлейкина-2 (IL-2), гамма-интерферона (IFN- γ), фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) в крови мышам определяли методом иммуноферментного анализа диагностикумами Clon Cloud Co (США) и Cusabio Biotech Co (Китай) на иммуноферментном анализаторе Zenyth 340 (Anthos).

Количество дефензинов $\alpha 1$ (DEF $\alpha 1$), дефензинов $\beta 1$ (DEF $\beta 1$) и легочного сурфактантного белка А (SP-A) в крови экспериментальных животных определяли методом ИФА диагностикумами Clon Cloud Co (США), Agilent Technologies (США).

Статистическую обработку данных проводили по программе Statistica [7].

Результаты и обсуждения

Известно, что Toll-подобные рецепторы (TLR) играют первичную роль в распознавании общих для всех патогенов молекул [8] Poly I:C, используемая в исследовании, как широко применяемый индуктор модели вирусного воспаления взаимодействовала в клетках с Toll-подобными рецепторами TLR-3, вызывала повреждение эндотелия лёгких и альвеолярной ткани и включал воспалительную реакцию. Действие Adv2 усиливало провоспалительный эффект с нарушением клеточно-

опосредованного иммунитета. Происходило разрушение эндотелия и альвеол лёгких, с высвобождением в кровеносные сосуды сурфактантного белка S-РА, обладающего способностью стимулировать хемотаксис фагоцитов и продукцию провоспалительных цитокинов, что подтверждалось пятикратным повышением количества S-РА в крови белых мышей второй (подопытной) группы по сравнению с показателями S-РА в крови мышей первой (контрольной) интактной группы (таблица).

Через 10 суток заражения в крови животных второй (подопытной) группы отмечали значительное повышение Т-хелперов CD4⁺ 22,76±0,58, по сравнению с 3,24±0,62 CD4⁺ первой (контрольной) группы, что вызвало повышение IFN-γ и IL2 в крови мышей второй подопытной группы на 50%, по сравнению с показате-

лями интерферона первой (контрольной) интактной группы. Повышение IFN-γ и IL2 связано с воздействием на клетки-мишени CD4⁺ и ингибированием вирусной репликации.

Значительное возрастание количества CD8⁺ и CD25⁺ в крови зараженных белых мышей второй (подопытной) группы рассматривалось, как попытка компенсации и адаптации организма к воспалительному процессу за счёт тимацитов и зрелых Т-лимфоцитов (таблица). Повышение в крови CD3⁺ лимфоцитов указывало на остроту процесса и усиление цитотоксичности к пораженным клеткам. Также отмечали увеличение количества провоспалительного интерлейкина IL-1β, запускающего каскад цитокиновых реакций связанный с разрушением клеток бронхиального эпителия и альвеолоцитов второго типа.

Таблица 1. Изучение влияния рекомбинантного колицина E2 на клеточный иммунитет в модели вирусной пневмонии у белых мышей

Показатели	Первая группа n=10 контрольная интактная	Вторая группа n=10 подопытная Poly I:C+Adv2	Третья группа n=10 подопытная после курса Rec ColE2
CD3 ⁺ (10 ⁶ /мл)	3,86±0,54	14,8±0,18*	5,05±0,46**
CD4 ⁺ (10 ⁶ /мл)	3,24±0,62	22,76±0,58*	4,26±0,35**
CD8 ⁺ (10 ⁶ /мл)	2,32±0,12	16,24±0,88*	3,42±0,82**
CD25 ⁺ (10 ⁶ /мл)	0,24±0,04	4,19±0,27*	0,36±0,18**
IL-1β(пг/мл)	154,2±16,9	610,5±11,8*	137,9±8,12**
IL-2(пг/мл)	520,4±21,5	1140,8±14,2*	630,4±15,8**
IFN-γ(пг/мл)	824,5±11,84	1245,9±12,5	955,8±19,5
TNF-α(пг/мл)	386,8±10,88	890,56±15,37*	420,5±9,88**
DEFα1(пг/мл)	41,4±7,25	590,4±18,25*	52,2±8,15**
DEFβ1(пг/мл)	28,8±5,16	340,8±21,2*	38,4±4,13**
SP-A(нг/мл)	14,5±0,28	72,5±1,24*	16,2±0,85**

* P<0,5 – по отношению к первой (контрольной) интактной группе;

** P<0,5 – по отношению ко второй (подопытной) группе.

Активация пролиферации иммуноферментных клеток и увеличение синтеза IFN-γ и фактора некроза опухоли TNF-α в крови мышей второй (подопытной) группы под воздействием Poly I:C и Adv-2 индуцировали повышенную экспрессию DEFα1 и DEFβ1. Дефензины этих структурных групп блокировали вирусные рецепторы и взаимодействовали с инфицированными альвеолоцитами и клетками бронхиального эпителия. Но увеличение их количества

в крови белых мышей второй подопытной группы не повлияло на развитие вирусного процесса (таблица).

В крови животных третьей подопытной группы после 8-дневного курса внутрибрюшинных инъекций Rec ColE2 отмечали нормализацию количества CD4⁺, CD8⁺ и CD3⁺ в связи с подавлением инфекционно-токсического синдрома и снижением пролиферации Т-лимфоцитов в кровяные сосуды [9, 10, 11]. Известно о Tol-зависимой

системе транслокации у колицинов и сходстве действия колицинов с механизмом действия фагов [12, 13]. Есть вероятность, что при воздействии Rec ColE2 на проницаемость альвеолоцитов и эпителиальных клеток дыхательного тракта и активации TLR-системы, повышалась возможность распознавания генома Adv-2. Кроме того, Rec ColE2 активировал DEF α 1, который ингибировал аденовирус, предотвращал раскрытие вируса и высвобождение эндосомального белка IV во время проникновения в клетку. При этом связывание дифензина с участием капсида вируса в области пептонов, блокировало этапы снятия покрытия для высвобождения белка VI аденовируса [14]. В дальнейшем количество DEF α 1 и DEF β 1 приходили в физиологическую норму (таблица). В крови животных третьей подопытной группы отмечали снижение количества CD25⁺ и, соответственно, снижение экспрессии противовоспалительных цитокинов IL-2 и TNF- α . На значительное снижение вирусной репликации у белых мышей третьей подопытной группы указывало 57%-ное снижение количества IFN- γ по сравнению с данным показателем во второй подопытной группе.

Заключение

В результате выполненных исследований установлено, что при поражении организма белых мышей при интраназальном

введении Poly I:C и Adv-2 на 11-й день эксперимента отмечалось резкое повышение Т-лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD25⁺ в виде ответной реакции клеточного иммунитета. Повышение противовоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-2, IFN- γ и TNF- α указывало на острый воспалительный процесс вирусного генеза. Повышение SP-A в крови зараженных белых мышей указывало на разрушение клеток бронхиального эпителия и альвеолоцитов.

Значительное увеличение количества DEF α 1 и DEF β 1 отражало активную противовирусную дефензиную защиту организма при заражении Adv-2.

Отмечалось выраженное иммунопротективное действие Rec ColE2 на клеточный иммунитет белых мышей после инъекционного курса. В ходе исследований установлена нормализация показателей CD Т-лимфоцитов различных популяций и соответствующее снижение количества в крови экспериментальных мышей провоспалительных цитокинов до уровня значений интактных животных.

Отмечалась активация Rec ColE2 дефензинов DEF α 1 и DEF β 1, свидетельствующая об их роли в подавлении вирусного процесса.

Полученные результаты подтверждают достоверное влияние Rec ColE2 на активацию клеточного иммунитета у белых мышей при вирусном заражении Adv-2.

Библиографический список

1. Lvov N.I., Peredelsky E.V., Grishin I.S. Frequency of isolation of adenovirus in young people from organized and the clinical significance of relevant serotypes 3rd Pan European // Congress of Military Medicine: scientific abstracts. – Belgrade, 2014. – 139 p.
2. Гаффаров Х.З. Ретроспективный анализ респираторно-кишечных вирусов, циркулирующих среди поголовья крупного рогатого скота в регионе Среднего Поволжья // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т. 216. – С. 78-84.
3. Chapron C.D. Detection of astroviruses, enteroviruses and adenoviruses types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and integrated cell culture-nested PCR procedure // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – № 66. – P. 2520-2525.
4. Romanowski E.G., Gordon Y.J., Araullo-Cruz T. The antiviral resistance and replication of cidofovir-resistant adenovirus variants in the New Zealand white rabbit ocular model // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2001. – V. 42. – №8. – P. 1812-1815.
5. Lehmkuhl H.D., Habbs L.A. Serologic and hexon phylogenetic analysis of ruminant adenoviruses // Arch. Virol. – 2008. – № 153. – P. 891-897.

6. Coca S.P., Perazella M.A. Rapid communication: acute renal failure associated with tenofovir: evidence of drug-induced nephrotoxicity // *Am J Med Sci.* – 2002. – V. 324. №6. – P. 342-344.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера. 2002. – 312 с.
8. Салмина А.Б., Бойцова Е.Б., Моргун А.В., Панина Ю.А., Горина Я.В., Писарева Н.В., Нода М., Кутищева И.А., Мартынова Г.П. Экспрессия NLRP3 инфламмасом церебрально-го эндотелия при воспалении вирусного генеза *in vitro* // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2017. – №16 (4). – С. 242-249. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-242–249
9. Азямов М.А., Тихонов И.В., Девришов Д.А. Получение гибридного колицина E2 // *Ветеринарная медицина.* – 2002. – №1. – С. 13. <http://www.veterinarymedicine.ru/num1-2002.html>.
10. Азямов М.А., Воронин Е.С., Тихонов И.В., Девришов Д.А., Маслов С.А., Зверьков Д.А. Изучение биологических свойств гибридного колицина E2, полученного с использованием питательных сред из непищевого сырья // *Тезисы докл. Всероссийской науч.-практич. конф., посвящ. 30-летию ВНИТИБП.* – Щелково, М.: РСХА, 2001. – С. 356-357.
11. Азямов М.А. Штамм бактерий *B.subtilis* pbColE2 – продуцент гибридного колицина E2, используемый для получения ветеринарного препарата. Патент №2188233 от 27.08.2002.
12. Gratia J.P. Colicins in the Encyclopedia of Genetics // Academic Press. 2001. – P. 417-418. Doi:Org/10.1006/Rwgn.2001.0245
13. Smith J.G., Silvestry M., Lindert S., Lu W., Nemerow G.R., Stewart Ph.L. Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization // *PLoS Pathog.* 2010 Jun 24. №6 (6): e1000959. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000959
14. Sharma O., Zakharov S.D., Zhalnina M.V., Yamashita E., Cramer W.A. Handbook of Biologically Active Peptides // Academic Press. 2013. P. 93-100. DOI: ORG/10.1016/B978-0-12-385095-9.00017-8.

THE IMMUNOPROTECTIVE RECOMBINANT COLICIN E2 ACTION ON A VIRAL GENESIS'S PNEUMONIA WHITE MICE'S MODEL

M.A. Azyamov, *Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher*
Federal Agricultural Research Center of North-East named N.V. Rudnitskiy
(Russia, Kirov)

Abstract. *The research goal – to explore the immunoprotective recombinant colicin E2 (Rec ColE2) action on a viral genesis's pneumonia in white mice's model. The three groups of non-linear white mice were formed. The first (control) was intact. The second (experimental) mice's group were administered intranasally 50 mcl polynosinic:polycitidylic acid and after 24 hours 50 mcl of adenovirus type 2 of cattle solution (on the mouse). The third group's animals droved inside the peritoneum of Rec ColE2 in a dose of 0,1 ml (100 mg) per head for 8 days once day. The mice were decapitated on the 11th day. Immunophenotyping of T-lymphocytes in the blood was performed by flow cytometry. Cytokines, defensins, and surfactant protein A were determined by enzyme immunoassay. In the second group, an increase in the blood of T-lymphocytes CD3+, CD4+, CD8+ and CD25+, as well as the amount of interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin-2 (IL-2), interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor (TNF- α), surfactant protein A (SP-A), defensins α 1 and β 1 (DEF α 1, DEF β 1).*

Reliable data were obtained on the pronounced immunoprotective effect of Rec ColE2 on the cellular immunity of white mice. It was found that the drug reduced the level of CD3+, CD4+, CD8+ and CD25+ in the blood of animals to physiological levels and normalized the quantitative indicators of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , TNF- α , DEF α 1, DEF β 1 and SP-A.

Keywords: *adenovirus type 2 of cattle, defensins, CD T-lymphocytes, cellular immunity, cytokines, cytometry cell analysis, immunophenotyping, recombinant colicin E2, white mice.*