

УДК 616.831-002-022:578.833.26-07:616.155.32]-092.9

СУБПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ВАРИАНТАМИ ОДНОГО ШТАММА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

*О. В. Мотузова¹, Э. А. Ахматова², В. Г. Хоменков³,
Н. К. Ахматова³, О. В. Лебединская^{4*}, Г. Г. Карганова¹*

¹*Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова, г. Москва,*

²*Первый Московский государственный медицинский университет
им. И. М. Сеченова, г. Москва,*

³*НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, г. Москва,*

⁴*Пермский государственный медицинский университет
им. академика Е. А. Вагнера, г. Пермь, Россия*

SUBPOPULATION LYMPHOCYTE STRUCTURE IN EXPERIMENTAL MOUSE INFECTION CAUSED BY VARIANTS OF ONE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS STRAIN

*O. V. Motuzova¹, E. A. Akbmatova², V. G. Khomenkov³,
N. K. Akbmatova³, O. V. Lebedinskaya^{4*}, G. G. Karganova¹*

¹*Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis named after M. P. Chumakov, Moscow,*

²*First Moscow State Medical University named after I. M. Sechenov, Moscow,*

³*Scientific Research Institute of Vaccines and Sera named after I. I. Mechnikov, Moscow,*

⁴*Perm State Medical University named after E. A. Wagner, Perm, Russian Federation*

Цель. Изучить иммунофенотипические особенности лимфоцитов мышей при экспериментальной инфекции, вызванной клонами 57 и 58, являющимися вариантами одного штамма вируса клещевого энцефалита (ВКЭ).

Материалы и методы. Было изучено влияние вариантов 57 и 58, выделенных из популяции одного штамма ВКЭ, на иммунофенотипические особенности лимфоцитов инфицированных мышей.

Результаты. В нашем исследовании варианты 57 и 58 были близки по своему воздействию на структуру субпопуляций лимфоцитов. Вирусы не оказывали влияние на численность Т-лимфоцитов, но в той или иной мере вызывали снижение численности NKT-клеток ($p < 0,05$) и Т-регуляторных клеток ($p < 0,05$). Оба варианта также повышали ($p < 0,05$) уровень клеток с ранним маркером активации

© Мотузова О. В., Ахматова Э. А., Хоменков В. Г., Ахматова Н. К., Лебединская О. В., Карганова Г. Г., 2015
e-mail: lebedinska@mail.ru
тел. 8 902 799 56 07

[Мотузова О. В. – младший научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов; Ахматова Э. А. – студентка 3 курса лечебного факультета; Хоменков В. Г. – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунологии, лаборатория механизмов регуляции иммунитета; Ахматова Н. К. – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией механизмов регуляции иммунитета; Лебединская О. В. (*контактное лицо) – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии; Карганова Г. Г. – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией биологии арбовирусов].

(CD45/CD25). Отличительной особенностью варианта 57 была индукция численности В-лимфоцитов (CD45/CD19, $p < 0,05$). Смешанное инфицирование животных вариантами 57 и 58 вызывало дисбаланс иммунного ответа, характеризующийся снижением численности пула Т-лимфоцитов, Т-хелперов, НК-клеток и повышением уровня В-лимфоцитов.

Выводы. Таким образом, на ранних этапах инфекционного процесса продемонстрирована способность вариантов ВКЭ, являющихся компонентами одной вирусной популяции, модулировать эффекторные функции врожденного и адаптивного иммунитета.

Ключевые слова. Вирус клещевого энцефалита, иммунный ответ, лимфоциты, экспериментальная инфекция.

Aim. To study the immunophenotypical peculiarities of mice lymphocytes in experimental infection caused by clones 57 and 58, as the variants of one Tick-borne encephalitis virus (TBEV) strain.

Materials and methods. The influence of variants 57 and 58, extracted from the population of one TBEV strain, on immunophenotypical peculiarities of infected mice lymphocytes was studied.

Results. In our study, variants 57 and 58 were close by their effect on the structure of lymphocyte subpopulations. The viruses did not influence T lymphocyte number, but in this or that extent, they caused decrease in the number of NKT ($p < 0,05$) and T-regulatory cells ($p < 0,05$). Both variants also elevated ($p < 0,05$) the level of cells with early activation marker (CD45/CD25). The specific feature of variant 57 was induction of B lymphocyte number (CD45/CD19, $p < 0,05$). Mixed infection of animals with variants 57 and 58 induced disbalance of immune response, characterized by fall in the number of T lymphocyte, T helper, NK cell pools and rise in B lymphocyte level.

Conclusions. Thus, the ability of TBEV variants, as the components of one viral population, to modulate effector functions of hereditary and adaptive immunity at early stages of infectious process was demonstrated.

Key words. Tick-borne encephalitis, immune response, lymphocytes, experimental infection.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к группе флавивирусов млекопитающих, переносимых клещами. Репликация ВКЭ в центральной нервной системе приводит к серьезным неврологическим расстройствам, таким как менингит, энцефалит или менингоэнцефалит. В настоящее время патогенетические механизмы клещевого энцефалита, в том числе взаимодействие вируса с иммунной системой, активно изучаются, но все еще остаются не до конца ясными.

В экспериментах на лабораторных животных было показано, что штаммы ВКЭ могут значительно различаться по своим патогенетическим характеристикам. Например, при инфекции, вызванной периферическим введением штамма Софьин, наблюдается более короткая средняя продолжительность жизни и более высокая летальность по сравнению с другими штаммами, такими как

Осима [6, 11]. Каким образом вирулентность вируса связана с особенностями формирования иммунного ответа при флавивирусной инфекции, остается изученным недостаточно.

Как и другие вирусы, ВКЭ обладает способностью модифицировать действие иммунной системы и уходить от его распознающего влияния. Например, вирус приводит к формированию внутриклеточных везикул, которые могут защищать вирусную РНК от клеточного распознавания через RIG-I- и MDA-5-пути [14, 15, 21] и таким образом отодвигать время начала индукции ИФН 1-го типа. ВКЭ также обладает способностью к репликации в разных типах клеток иммунной системы. Показано, что Т-клетки могут поддерживать репликацию штаммов вируса КЭ: Абсеттаров, Найдорфл, Нурт 71 [8]. В литературе имеются сведения о взаимодействии дендритных клеток и вируса КЭ [8, 17]. Однако эти данные носят фрагментарный характер, в настоящее время недостаточно изучены молекулярно-клеточные механизмы взаимодействия вируса с макроорга-

низмом, в частности мало известно о влиянии эффекторов как врожденного, так и адаптивного иммунитета на течение КЭ.

Показано, что ВКЭ может существовать в виде стабильной гетерогенной популяции, содержащей варианты, обладающие селективным преимуществом при репродукции либо в клещах, либо в млекопитающих. Варианты одного и того же штамма могут значительно различаться по своим патогенетическим характеристикам и, соответственно, по способности индуцировать противовирусный иммунный ответ. Характер активации врожденного и адаптивного иммунного ответа может зависеть от соотношения этих вариантов в популяции.

Цель работы – изучение иммунофенотипических особенностей лимфоцитов мышей при экспериментальной инфекции, вызванной клонами 57 и 58, являющимися вариантами одного штамма ВКЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Использованы мыши линий Balb/c (SPF, самки, 15–16 г), полученные из питомника лабораторных животных «Пушино», содержащиеся в условиях вивария ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова».

Вирусы, используемые в работе. ВКЭ: варианты 57 и 58, полученные клонированием бляшек из популяции адаптированного к клещам варианта штамма ЭК-328 (Romanova et al., 2007). Штамм относится к сибирскому подтипу ВКЭ. Варианты 57 и 58 отличаются друг от друга двумя аминокислотами в поверхностном белке Е. Ранее в экспериментах на мышцах клоны продемонстрировали различия по нейтроинвазивности и чувствительности к интерферону.

Животных заражали интраперитонеально, по 0,3 мл 1 000 000 БОЕ вируса в виде культурально-жидкостно-инфицированных клеток почки эмбриона свиньи. В каждой группе исследовано по 6 мышей.

Получение суспензии мононуклеарных лейкоцитов (МЛ). Суспензию спленоцитов получали, гомогенизируя селезенку в 5 мл среды RPMI 1640 (ПанЭко, Россия). Клетки осаждали 10 мин центрифугированием со скоростью 250 g в мин при температуре 4 °С. Осадок ресуспендировали и удаляли эритроциты гипотоническим шоком: к осадку добавляли 900 мкл дистиллированной воды и перемешивали 10 с, затем добавляли 100 мкл 10-кратного раствора Хэнкса (МПБП, Россия). После лизиса эритроцитов спленоциты осаждали и дважды отмывали средой RPMI. Подсчет живых и мертвых клеток проводили в камере Горяева, используя 0,1%-ный раствор трипанового синего в 0,9%-ном растворе NaCl.

Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки мышей осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител против соответствующих антигенов различных субпопуляций лимфоцитов. Клетки отмывали холодным фосфатно-солевым буфером с 1%-ной фетальной телячьей сывороткой и окрашивали согласно инструкции производителя (e-Bioscience, США) моноклональными антителами, меченными флюорохромом к поверхностным клеточным маркерам (CD3, CD4, CD8, CD19, МНС II, меченые FITC; CD25, NK1.1 – PE; Foxp3 – APC, CD45 – PerC7). Затем клетки отмывали 2 раза холодным фосфатно-солевым буфером с 1%-ной фетальной телячьей сывороткой. Результаты учитывали на проточном цитометре FC-500 (фирмы Beckman Coulter, США). Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 10 000 клеток в гейте.

Статистическую значимость различий уровня цитокинов между группами оценивали непараметрическими методами исследования с помощью критерия Манна-Уитни. Статистически достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние штаммов ВКЭ на субпопуляционную структуру лимфоцитов селезенок мышей Balb/c

Маркеры	Количество клеток, $M \pm Sd$, %				
	ЭК	58	57	57 + 58	Интактные
CD45/CD3	59,4 ± 4,2* ↑	32,8 ± 2,8	39,8 ± 2,1	19,5 ± 1,2* ↓	32,5 ± 3,1
CD16/32	2,1 ± 0,3* ↓	3,0 ± 0,2* ↓	1,8 ± 0,4* ↓	3,9 ± 0,4* ↓	7,3 ± 0,6
NKT (CD3/CD16/32)	0,8 ± 0,2* ↑	0,1 ± 0,04* ↓	0,1 ± 0,03* ↓	0,4 ± 0,4	0,4 ± 0,05
CD3/CD4	43,8 ± 4,1* ↑	22,7 ± 2,1	28,4 ± 2,1	13,1 ± 0,9* ↓	25,6 ± 1,5
CD45/CD25	14,0 ± 0,8* ↑	15,3 ± 1,2* ↑	13,4 ± 1,0* ↑	13,1 ± 1,8* ↑	9,0 ± 0,4
T-reg CD4/CD25/Foxp3	0,4 ± 0,05* ↓	0,5 ± 0,03* ↓	0,3 ± 0,02* ↓	0,3 ± 0,03* ↓	0,9 ± 0,4
CD45/CD19	23,2 ± 2,1* ↑	14,0 ± 1,1	19,8 ± 1,5* ↑	18,0 ± 1,6* ↑	14,2 ± 1,5
CD45/МНСII	33,4 ± 2	39,0 ± 2,4	34,3 ± 3,1	35,3 ± 4,0	37,6 ± 3,7
CD3/CD8	12,3 ± 1,1* ↑	7,4 ± 0,5	7,2 ± 0,7	10,5 ± 1,2	8,0 ± 0,5

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с контролем (интактные мыши) $p < 0,05$, U-тест Манна-Уитни для независимых выборок.

Антиген CD3 является маркером зрелых Т-лимфоцитов и представлен на медуллярных тимоцитах и Т-лимфоцитах периферической крови. Этот антиген является высоко специфическим, и выявление CD3 четко указывает на принадлежность Т-лимфоцитов к зрелым этапам дифференцировки этих клеток [2, 13, 16]. Основным фактором, препятствующим активному размножению вирусов и инфицированию пораженного организма, являются зрелые цитотоксические лимфоциты (CD8 Т-клетки, CTL), обладающие важным свойством – специфичностью действия на клетку-мишень, т.е. способностью уничтожать только клетки, пораженные вирусными частицами [20].

В нашем исследовании варианты 57 и 58 оказывали супрессирующее влияние на NK клетки (с 7,3 % в контроле) до 3 % (вариант 58) и до 1,8 % (вариант 57).

Исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенок мышей, зараженных вариантами ВКЭ, выявило некоторые особенности. Оба вируса не вызывали повышение численности Т-клеток (CD45/CD3) по сравнению с интактными мышами. Количество Т-хелперов (CD3/CD4) и CTL (цитотоксических лимфоцитов (CD3/CD8) оставалось также на уровне контроля (таблица).

В настоящее время известно, что NK-клетки играют важную биологическую роль в механизмах иммунологического надзора, направленного против опухолевых клеток, инфицированных вирусами и паразитами клеток, за счет регуляции процессов пролиферации и дифференцировки клеток костного мозга, элиминации стареющих соматических клеток, модуляции клеток врожденного иммунитета, активации, пролиферации или супрессии Т- и В-лимфоцитов, а также процессов созревания и генерации вирусспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, что позволяет рассматривать их как существенный компонент неспецифической защиты организма и клеточно-опосредованного иммунного ответа [5, 9, 18].

Известно, что в популяции активированных лимфоцитов, наряду с ЦТЛ и НК,

присутствуют натуральные киллеры – Т-клетки (NKT), экспрессирующие маркеры NK-клеток (CD16, CD56), и Т-клеточные дифференцировочные антигены (CD3, CD4, CD8) [1, 10, 12]. Эта субпопуляция лимфоцитов обнаруживается в основном при инфекционном процессе в печени и легких, но практически отсутствует в периферической крови [19]. У мышей, зараженных вариантами 57 и 58, снижалось содержание NKT-клеток с 0,4 % (в контроле) до 0,1 % ($p < 0,05$) и T-regs с 0,9 % (в контроле) до 0,3 % (вариант 57) и 0,5 % (вариант 58). Вирусы также повышали ($p < 0,05$) уровень клеток с ранним маркером активации (CD45/CD25) в 1,5–1,7 раза (вариант 57 – 13,4 %, вариант 58 – 15,3 %). Отличительной особенностью варианта 57 была индукция повышения численности В-лимфоцитов (CD45/CD19) в 1,4 раза по сравнению с вариантом 58 (соответственно 19,8 и 14 %).

Смешанное инфицирование мышей вариантами 57 и 58 привело к неожиданным результатам. У мышей, одновременно зараженных данными вирусами, отмечалась иммуносупрессия со снижением количества Т-клеток (в 1,7 раза, с 32,5 до 19,5 %), преимущественно представленных субпопуляцией Т-хелперов (CD3/CD4), 1,95 раза (с 25,6 до 13,1 %) по сравнению с интактными мышами. При этом наблюдалась тенденция к повышению численности В-лимфоцитов (с 14,2 до 18 %, $p < 0,05$). Иммунный ответ у этих мышей также характеризовался преобладанием субпопуляций клеток с экспрессией маркера активации CD25 (13,1 %). Об активации процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов свидетельствует усиление экспрессии маркера рецептора для IL-2 (CD25). Молекула CD25 маркирует активированные Т-лимфоциты вне зависимости от их субпопуляционной принадлежности и активированные В-клетки [7].

Таким образом, варианты одного штамма ВКЭ практически не отличались по сво-

ему действию на субпопуляционную структуру лимфоцитов инфицированных мышей по отдельности, но в эксперименте со смешанной инфекцией проявили неожиданные свойства.

Оба клона в той или иной мере вызывали снижение численности NK-клеток и Т-регуляторных клеток. Вариант 57 вызывал увеличение численности В-лимфоцитов. Комбинированное заражение животных вариантами 57 и 58 вызывало дисбаланс иммунного ответа, характеризующийся снижением численности пула Т-лимфоцитов, Т-хелперов, NK-клеток и повышением уровня В-лимфоцитов. Вирусы при одновременном заражении мышей индуцировали активацию эффекторов иммунной системы.

Известно, что глубокий дефицит Т-клеточного звена иммунитета в острой фазе инфекционного процесса, а также дисфункция гуморального и цитокинового звеньев иммунной системы влекут за собой тяжелое течение КЭ [3]. Нами показано, что заражение вариантами одного штамма ВКЭ в виде моноинфекции и смешанной инфекции разнонаправленно влияет на экспрессию дифференцировочных и активационных молекул на эффекторах врожденного и адаптивного иммунитета. Таким образом, на ранних этапах инфекционного процесса продемонстрирована способность вариантов ВКЭ, являющихся компонентами одной вирусной популяции, модулировать эффекторные функции врожденного и адаптивного иммунитета.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Ахматова Н. К., Киселевский М. В.* Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противоионфекционный. М.: Практическая медицина 2008; 256.
2. *Исаков В. А.* Клинико-патогенетические аспекты тяжелого гриппа. Аллергология и иммунология 2004; 3 (1): 136–144.

3. Крылова Н. В. Клеточные и молекулярные механизмы противовирусной защиты при клещевом энцефалите: дис. ... д-ра мед. наук. М. 2014; 229.

4. Юсупова Р. Ш., Сибиряк С. В., Каюмова Э. Ю., Сибиряк Д. С. Экспрессия Fas-антигена на лимфоцитах периферической крови и антигенспецифический апоптоз лимфоцитов при туберкулезе легких. Мед. иммунология 2000; 2 (2): 205–206.

5. Bhardwaj N. Harnessing the immune system to treat cancer. J. Clin. Invest 2007; 117 (5): 1130–1136.

6. Chiba N. Pathogenicity of tick-borne encephalitis virus isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. Vaccine 1999; 17: 779–787.

7. Diefenbach A., Raulet D. H. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. Immunol. Rev. 2002; 188: 9–21.

8. Dörrbecker B., Dobler G., Spiegel M., Hufert F. T. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. Travel. Med. Infect. Dis. 2010; 8 (4): 213–222.

9. Duwaerts C. C., Sun E. P., Cheng C. W., van Rooijen N., Gregory S. H. Cross-activating invariant NKT cells and kupffer cells suppress cholestatic liver injury in a mouse model of biliary obstruction. PLoS One 2013; 8 (11): e79702.

10. Hall B. M., Tran G. T., Robinson C. M., Hodgkinson S. J. Induction of antigen specific CD4+CD25+Foxp3+T regulatory cells from naïve natural thymic derived T regulatory cells. Int. Immunopharmacol. 2015; pii: S1567-5769(15)00151-4.

11. Hayasaka D. Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. Virology 2009; 390: 139–150.

12. Hudspeth K., Pontarini E., Tentorio P., Cimino M., Donadon M., Torzilli G. The role of natural killer cells in autoimmune liver disease:

A comprehensive review. J. Autoimmun 2013; 46: 55–65.

13. Matsuoka H., Fujimura T., Mori et al. Mechanism of HDAC inhibitor FR235222-mediated IL-2 transcriptional repression in Jurkat cells. Int. Immunopharmacol 2007; 7 (11): 1422–32.

14. Overby A. K., Popov V. L., Niedrig M., Weber F. Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles. Journal of virology 2010; 84 (17): 8470–8483.

15. Palus M., Bilý T., Elsterová J., Langbansová H., Salát J., Vancová M., Růžek D. Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus. J. Gen. Virol. 2014; 95 (11): 2411–2426.

16. Preza G. C., Yang O. O., Elliott J., Anton P. A., Ochoa M. T. T lymphocyte density and distribution in human colorectal mucosa, and inefficiency of current cell isolation protocols. PLoS One 2015; 10 (4): e0122723.

17. Robertson S. J., Mitzel D. N., Taylor R. T., Best S. M., Bloom M. E. Tick-borne flaviviruses: dissecting host immune responses and virus countermeasures. Immunol. Res. 2009; 43 (1–3): 172–186.

18. Savage P. B. Vaccine development: NKT-cell adjuvants in conjugate. Nat. Chem. Biol. 2014; 10 (11): 882–883.

19. Takeda K., Okumura K. CAM and NK Cells. eCAM 2004; 1 (1): 17–27.

20. Xu J., Wu R., Xiang F., Kong Q., Hong J., Kang X. Diversified phenotype of antigen specific CD8+ T cells responding to the immunodominant epitopes of IE and pp65 antigens of human cytomegalovirus. Cell. Immunol. 2015; 295 (2): 105–111.

21. Yu C., Achazi K., Niedrig M. Tick-borne encephalitis virus triggers inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) and transcription factor 6 (ATF6) pathways of unfolded protein response. Virus Res. 2013; 178 (2): 471–477.

Материал поступил в редакцию 29.09.2015