

УДК 616.831-002-022:578.833:612.017.11

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ НА РАННИХ СТАДИЯХ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА У ВАКЦИНИРОВАННЫХ И НЕВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛЮДЕЙ

Н.В. Крылова, Г.Н. Леонова, Е.В. Павленко

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, цитокины.

Проведено сравнительное исследование уровня цитокинов в сыворотке крови, а также спонтанной и индуцированной продукции цитокинов клетками крови у лиц с кратковременной антигемией вируса клещевого энцефалита, вакцинированных и невакцинированных против клещевого энцефалита. У невакцинированных на ранней стадии инфицирования выявлено повышение содержания провоспалительных цитокинов как *in vivo*, так и *in vitro*. В эти же сроки у вакцинированных пациентов отмечалось увеличение продукции иммунорегуляторных цитокинов. Наличие высокой цитокинпродуцирующей активности клеток периферической крови обследованных нами пациентов на ранней стадии инфицирования является одним из решающих факторов быстрой элиминации вируса.

В настоящее время все большее внимание обращается на первостепенную роль системы цитокинов в реализации функций врожденного и приобретенного иммунитета при защите организма от инфекций. Среди набора цитокинов, обычно определяемого в клинической практике, выделяют цитокины врожденного иммунитета – интерлейкины (IL) 1 β , 6, 8, 10, α -интерферон (IFN- α), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), секретируемые, в основном, вспомогательными клетками, и цитокины адаптивного иммунного ответа (IL-2, IFN- γ , IL-4), главными продуцентами которых являются Т-хелперы 1-го и 2-го типов [2, 3]. Многочисленные факты указывают на наличие тесной взаимосвязи между уровнем продукции этих цитокинов и клиническими характеристиками инфекционного процесса [7, 11, 15]. Важным практическим аспектом при оценке цитокинового звена иммунитета на ранней стадии заболевания является возможность прогноза течения и исхода инфекционного процесса.

Известно, что одним из традиционных способов защиты населения от вирусных инфекций, в том числе и от клещевого энцефалита (КЭ), является вакцинация. Сравнительное изучение особенностей цитокинового профиля у вакцинированных и невакцинированных лиц после попадания вируса КЭ в организм представляется весьма важным для детального понимания иммунопатогенеза инфекции, а также для оценки влияния вакцинации на инфекционный процесс.

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка продукции цитокинов врожденного и адаптивного иммунитета у вакцинированных против КЭ и невакцинированных лиц после укуса клеща.

Материалы и методы. Обследованы 124 человека от 18 до 60 лет, у которых на 2–4-е сутки после укуса клеща

в крови был выявлен антиген вируса КЭ. Из них 46 человек (возраст $41,0 \pm 12,3$ года) за 2–5 месяцев до укуса были вакцинированы против КЭ. Невакцинированные лица (возраст $42,0 \pm 13,0$ года) с жалобами на укус клеща после обнаружения специфического антигена получали однократно профилактическую дозу (1 мл/10 кг массы тела) противоклещевого иммуноглобулина согласно СП 3.1.3.23-52-08 [9]. Вакцинированным противоклещевой иммуноглобулин не вводили. Повторное обследование на наличие антигена вируса КЭ проводили через 1 месяц, а при необходимости – через 6 месяцев и позже. Контрольную группу (условно-здоровые доноры) составили 25 человек (возраст $39,0 \pm 8,9$ года), отрицавших факт присасывания клеща.

Для выявления антигена вируса КЭ в крови у лиц с укусом клеща использовали экспресс-диагностику при помощи иммуноферментного анализа с применением тест-системы ЗАО «Вектор-Бест» [6]. Уровень антигемии оценивали по показателю К (отношение оптической плотности исследуемой к оптической плотности критической пробы).

Для изучения уровня сывороточных цитокинов периферическую кровь у инфицированных лиц забирали шприцем из локтевой вены дважды: первый раз – на 2–4-е сутки после укуса клеща, до введения противоклещевого иммуноглобулина и второй раз – через месяц. Кровь инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем, после центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 мин, собирали сыворотку, которую замораживали и хранили до тестирования при -20°C . Для определения продукции цитокинов клетками периферической крови, гепаринизированную (25 ЕД/мл) венозную кровь разводили в 3 раза стерильной средой RPMI 1640 (Sigma), содержащей 0,3 мг/мл L-глутамин (Sigma) и 80 мкг/мл гентамицина. Подготовленные таким образом образцы крови (по 1 мл) культивировали в круглодонных стерильных пробирках в присутствии конканавалина А (КонА, Sigma) в конечной концентрации 10 мкг/мл, а также в отсутствии митогенной стимуляции. Культивирование проводили при 37°C в CO_2 -инкубаторе в течение 48 часов, после чего отбирали супернатанты, замораживали и хранили до тестирования при -20°C . Определение концентрации цитокинов (пг/мл) в сыворотке и супернатантах проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью диагностических наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург).

При статистической обработке проверка нормальности распределения количественных признаков в

Крылова Наталья Владимировна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клещевого энцефалита НИИЭМ СО РАМН; e-mail: krylovanatalya@gmail.com

выборке осуществлялась с помощью W-критерия Шапиро–Уилка, определение значимости различий между группами – t-критерия Стьюдента (при нормальном распределении), для оценки взаимозависимости между параметрами – коэффициента корреляции Пирсона (r).

Результаты исследования. Уровень антигенемии в крови после укуса клеща в начальные сроки инфицирования (2–4-й день) у всех 124 обследованных лиц был относительно невысок: у вакцинированных он составил $3,42 \pm 0,57$, а у невакцинированных – $4,05 \pm 0,88$ (разница статистически недостоверна). При повторном обследовании (через 1 месяц) антиген вируса КЭ в крови этих лиц не обнаруживали. Это дало основание считать, что обследование проводилось в группах вакцинированных и невакцинированных лиц, у которых наблюдалась кратковременная антигенемия вируса КЭ.

При сравнительном анализе продукции цитокинов *in vivo* и *in vitro* у лиц с антигенемией изменения были выявлены в ранние сроки инфицирования. Поскольку при повторном обследовании инфицированных уровень цитокинов не отличался от такового в контрольной группе, мы приводим данные по продукции цитокинов только на 2–4-й дни исследования.

Так, в сыворотке крови невакцинированных пациентов в эти сроки отмечалось увеличение содержания провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-1 β , IFN- α , TNF- α). Однако значимые различия показателей в опытной группе по сравнению с таковыми у здоровых доноров зафиксированы только для IL-1 β и TNF- α . Корреляционный анализ показал наличие достоверной прямой взаимосвязи между содержанием в сыворотке IL-1 β и уровнем антигенемии вируса КЭ ($r = 0,74$). При этом показатель TNF- α /IL-4, характеризующий соотношение про- и противовоспалительных цитокинов, был увеличен у невакцинированных пациентов на 63,6% по сравнению с показателями в контрольной группе и на 50% по сравнению с таковыми у вакцинированных.

В свою очередь, вакцинированные в первую волну вирусемии отличались от здоровых доноров повышенным уровнем в сыворотке крови IFN- α и IFN- γ . Обнаружена прямая корреляционная зависимость между концентрацией в сыворотке IFN- α и уровнем антигенемии ($r = 0,73$). Отношение IFN- γ /IL-4, отражающее состояние баланса Т-хелперов 1-го и 2-го типов, у вакцинированных лиц лишь незначительно (на 13,6%, $p > 0,05$) превышало таковое у невакцинированных и здоровых доноров. Таким образом, значимые различия между группами вакцинированных и невакцинированных лиц, касающиеся содержания сывороточных цитокинов на ранних сроках инфицирования, выявлены для IL-1 β , IFN- α , TNF- α и IFN- γ , а также для коэффициента TNF- α /IL-4 (табл. 1).

Как известно, уровни цитокинов в сыворотке крови отражают состояние иммунной системы в настоящий момент времени [3]. Однако информативность данных показателей может оказаться недостаточной из-за короткого периода их полураспада и способности активно связываться с растворимыми рецепторами к

Таблица 1

Уровень цитокинов в сыворотке крови у вакцинированных и невакцинированных лиц, инфицированных вирусом КЭ

Цитокин	Уровень в сыворотке крови (M \pm σ), пг/мл		
	невакцинированные	вакцинированные	контроль
IL-8	17,2 \pm 4,3	16,3 \pm 4,1	16,1 \pm 3,3
IL-1 β	39,7 \pm 4,1 ¹	31,4 \pm 3,9 ²	25,3 \pm 4,1
IFN- α	14,9 \pm 3,7	20,4 \pm 3,9 ^{1,2}	14,3 \pm 3,1
TNF- α	11,4 \pm 3,7 ¹	8,2 \pm 3,2 ²	5,5 \pm 2,5
IFN- γ	26,3 \pm 5,3	30,4 \pm 6,2 ^{1,2}	22,3 \pm 3,1
IL-6	5,2 \pm 1,5	4,6 \pm 1,3	3,3 \pm 1,1
IL-4	6,4 \pm 1,7	7,0 \pm 1,7	5,6 \pm 1,4
IL-10	11,7 \pm 3,6	11,5 \pm 3,1	9,4 \pm 2,7
IFN- γ /IL-4	4,4 \pm 1,9	5,0 \pm 1,1	4,4 \pm 1,0
TNF- α /IL-4	1,8 \pm 0,5 ¹	1,2 \pm 0,4 ²	1,1 \pm 0,4

Здесь и в табл. 2: ¹ разница с контролем статистически значима; ² разница с группой «Невакцинированные» статистически значима.

цитокинам [1]. В ситуациях, связанных с дефицитом или дисбалансом регуляторных факторов, необходимо оценить способность клеток крови к секреции цитокинов *in vitro*. При этом спонтанная продукция цитокинов свидетельствует о том, насколько клетки крови уже активированы *in vivo*, а митогениндуцированная продукция – позволяет оценить их потенциальную способность к секреции цитокинов.

При сравнительной оценке спонтанной и индуцированной конканавалином А продукции цитокинов клетками периферической крови было установлено, что по сравнению со здоровыми донорами у невакцинированных лиц на 2–4-е сутки после укуса клеща в 1,4–2,7 раза повышается спонтанная и индуцированная способность клеток крови продуцировать все исследованные провоспалительные цитокины (IL-8, IL-1 β , IFN- α , TNF- α). Выявлена также прямая корреляционная связь между спонтанной продукцией IL-1 β и уровнем антигенемии вируса ($r = 0,56$). В этой группе инфицированных показатель TNF- α /IL-4 как для спонтанной, так и для индуцированной продукции цитокинов в 2 раза превышал таковой в контроле. У невакцинированных пациентов также было выявлено усиление спонтанной и индуцированной продукции IFN- α , достоверных различий в соотношении IFN- γ /IL-4 со здоровыми донорами не обнаружено (табл. 2).

У вакцинированных пациентов на 2–4-е сутки после инфицирования спонтанная и индуцированная продукция IFN- α , IFN- γ и IL-4 в 1,7–2,8 раза превышала уровни в группе здоровых. Зарегистрирована прямая корреляционная зависимость между спонтанной продукцией IFN- α и уровнем антигенемии ($r = 0,62$). При этом показатель IFN- γ /IL-4 для спонтанной и индуцированной продукции цитокинов в этой группе был в 1,7 раза выше, чем в контроле (табл. 2).

При сравнении спонтанной способности клеток периферической крови вакцинированных и невакцинированных лиц секретировать цитокины выявлены значимые различия в содержании IL-1 β , IFN- α , TNF- α ,

Таблица 2

Спонтанная и митогениндуцированная продукция цитокинов клетками крови вакцинированных и невакцинированных лиц, инфицированных вирусом КЭ

Цитокин	Продукция по группам (M±σ), пг/мл					
	невакцинированные		вакцинированные		контроль	
	спонтанная	индуцированная	спонтанная	индуцированная	спонтанная	индуцированная
IL-8	812,3±278,8 ¹	955,3±184,6 ¹	692,0±150,6	872,3±163,6	567,7±140,0	803,8±244,7
IL-1β	99,4±39,3 ¹	204,6±74,7 ¹	63,5±24,5 ²	151,7±59,1	57,1±12,1	98,4±35,3
IFN-α	48,9±12,4 ¹	53,0±19,2 ¹	64,8±17,5 ^{1,2}	63,9±19,8 ^{1,2}	37,7±2,0	38,7±5,0
TNF-α	57,0±13,5 ¹	261,3±99,8 ¹	33,1±10,8 ²	168,5±53,0	20,3±3,9	98,2±28,2
IFN-γ	81,4±22,7 ¹	179,1±53,3 ¹	191,5±56,3 ^{1,2}	289,4±81,8 ^{1,2}	52,0±18,2	112,3±47,9
IL-6	333,1±78,5	372,7±93,3	303,9±81,3	333,0±79,8	274,5±71,6	352,2±23,2
IL-4	19,8±6,3	20,3±8,3	33,1±13,4 ^{1,2}	29,1±12,9 ¹	15,4±2,4	19,7±6,4
IL-10	24,4±10,4	82,0±31,8	22,7±7,9	94,1±37,8	22,2±9,4	76,6±22,8
IFN-γ/IL-4	4,3±1,7	6,2±2,1	6,8±2,5 ¹	9,1±3,3 ¹	3,9±1,5	5,3±1,9
TNF-α/IL-4	3,7±1,2 ¹	10,0±4,2 ¹	1,6±0,6 ²	5,8±2,1	1,7±0,5	5,1±1,2

IFN-γ и IL-4. При этом достоверные различия в способности клеток к индуцированной продукции цитокинов обнаружены для IFN-α и IFN-γ. Из показателей IFN-γ/IL-4 и TNF-α/IL-4 в сравниваемых группах значимое отличие имело лишь последнее отношение при спонтанной продукции цитокинов (табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Многие исследователи рассматривают ранние стадии вирусной инфекции как «соревнование на скорость» между вирусом и системой защиты макроорганизма. Первая линия защиты здесь – кожный покров. Как только этот барьер преодолен, активируются факторы врожденного иммунитета (интерферон, естественные киллеры, макрофаги и дендритные клетки). Механизмы врожденного иммунитета при большинстве вирусных инфекций характеризуются способностью к быстрому индуцированию, относительно низкой специфичностью и состоят из трех основных фаз. В первой из них вирус подвергается атаке комплемента и сывороточных иммуноглобулинов, действие которых направлено на уничтожение внеклеточных вирусных частиц. Во второй фазе в действие включаются основные противовирусные медиаторы врожденного иммунитета – интерфероны I типа (α и β), секретируемые инфицированными эпителиальными клетками. Наконец, в третьей фазе борьбу с вирусом продолжают быстро мобилизованные эффекторы – нейтрофилы, макрофаги, естественные киллеры и секретируемые ими цитокины (IL-1, IL-6, IL-18, TNF-α) [12, 13, 14].

Проведенное нами исследование позволило установить, что на 2–4-е сутки после укуса клеща и инфицирования вирусом КЭ (эффektorная фаза врожденного противовирусного иммунитета) у невакцинированных лиц превалировала продукция провоспалительных цитокинов. Так, в сыворотке крови у них было повышено содержание IL-1β и TNF-α и усилена спонтанная и индуцированная способность клеток периферической крови к продукции IL-8, IL-1β, IFN-α, TNF-α. Не менее важно отметить активацию спонтанной и индуцированной продукции IFN-γ – иммунорегуляторного

цитокина, который, наряду с прямым действием на вирусную репликацию, способствует дифференцировке Т-хелперов 1-го типа и развитию приобретенного иммунитета. Таким образом, повышение продукции главных цитокинов врожденного иммунитета дает основание предположить возможную быструю элиминацию вируса.

Ранее нами было показано, что при кратковременной антигенемии вируса КЭ у невакцинированных пациентов на 2–4-е сутки после укуса клеща отмечалась активация гуморального звена иммунитета. Выявлен высокий уровень общего сывороточного иммуноглобулина класса G и его подклассов – G1 и G3, увеличение содержания C3-, C4- и C5-компонентов комплемента, повышение количества иммунных комплексов преимущественно крупных размеров [4]. Кроме того, при оценке клеточного звена иммунитета у подобных пациентов на ранней стадии инфицирования вирусом отмечалось повышение количества естественных киллеров [5].

Такая высокая активность всех звеньев иммунитета (цитокинового, гуморального и клеточного) у инфицированных, но не заболевших невакцинированных лиц свидетельствуют о том, что исходно эти люди были иммунологически компетентны. Таким образом, у этих невакцинированных на фоне невысокой антигенной нагрузки происходит активация клеточного и гуморального звеньев врожденного иммунитета, что вызывает развитие комплекса регулируемых цитокинами провоспалительных реакций, приводящих к быстрому уничтожению и элиминации вируса. Это нашло подтверждение в результатах их повторного обследования спустя 1 месяц.

Следует отметить, что при управляемых инфекциях, к которым относится КЭ, значительный компонент начальной резистентности организма представлен механизмами иммунологической памяти, приобретенной в результате предварительной вакцинации, в результате чего в организме накапливаются Т- и В-клетки памяти, которые при повторном заражении

ускоряют и усиливают специфические иммунные реакции защиты [8].

Полученные данные свидетельствуют о том, что у вакцинированных на ранних сроках инфицирования преобладала продукция иммунорегуляторных цитокинов адаптивного иммунного ответа. У этих пациентов отмечалось повышение уровня IFN- α и IFN- γ в сыворотке крови, усиление способности клеток крови к спонтанной и индуцированной продукции IFN- α , IFN- γ и IL-4, при этом соотношение IFN- γ /IL-4 свидетельствовало о доминировании Т-хелперного 1-го типа иммунного ответа. Кроме того, при кратковременной антигенемии у вакцинированных на момент инфицирования (2–4-е сутки) высокое содержание высокоавидных вирусспецифических иммуноглобулинов G и вируснейтрализующих антител, а также исходно высокого уровня общего сывороточного иммуноглобулина G и его подклассов позволили быстро распознать и нейтрализовать антиген вируса КЭ [4]. Таким образом, преобладание клеточного типа иммунного ответа в сочетании с исходно высоким уровнем гуморального иммунитета у вакцинированных лиц при невысокой вирусной нагрузке обеспечивало быструю элиминацию вируса.

Сравнительный анализ уровней цитокинов *in vivo* и *in vitro* у невакцинированных и вакцинированных лиц на ранней стадии инфицирования позволил выявить некоторые закономерности. В частности, было показано, что оптимальным является умеренное (в 2–3 раза) увеличение уровня провоспалительных цитокинов у невакцинированных. Это приводит к повышению резистентности организма за счет привлечения циркулирующих гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов. В то время как гиперактивация клеток иммунной системы, сопровождающаяся гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, трансформирует первоначально защитный механизм в патологический [10]. В свою очередь адекватное увеличение уровня иммунорегуляторных цитокинов у вакцинированных лиц и повышение продукции цитокинов Т-хелперами 1-го типа приводит к ранней активации механизмов адаптивного иммунитета. Кроме того, было установлено, что стандартный митоген (конканавалин А) активно стимулирует выработку цитокинов клетками периферической крови невакцинированных и вакцинированных пациентов, что свидетельствует о высоких резервных возможностях клеток.

Таким образом, комплексный анализ ранних цитокиновых реакций позволил дифференцировать различия в цитокиновом звене иммунитета у лиц, невакцинированных и вакцинированных против КЭ, на начальном этапе инфицирования. Наличие высокой цитокинпродуцирующей активности клеток периферической крови обследованных пациентов на ранней стадии инфицирования является одним из решающих факторов быстрой элиминации вируса КЭ, не требующих дополнительных лекарственных препаратов.

Литература

1. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // *Цитокины и воспаление*. 2003. Т. 2, № 3. С. 20–35.
2. Железникова Г.Ф. Цитокины как предикторы течения и исхода инфекций // *Цитокины и воспаление*. 2009. Т. 8. № 1. С. 10–16.
3. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. *Цитокины*. М.: Фолиант. 2008. 552 с.
4. Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Павленко Е.В., Максема И.Г. Сравнительное изучение гуморальных факторов иммунитета у инфицированных вирусом клещевого энцефалита лиц, не вакцинированных и вакцинированных против клещевого энцефалита // *Мед. иммунология*. 2009. № 2–3. С. 197–204.
5. Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Запорожец Т.С. и др. Сравнительная оценка количественного состава субпопуляций лимфоцитов у лиц, инфицированных вирусом клещевого энцефалита, с различной длительностью антигенемии // *Мед. иммунология*. 2009. № 4–5. С. 389–390.
6. Леонова Г.Н., Борисевич В.Г. Способ выделения арбовирусов, в частности клещевого энцефалита. Патент № 2205652 от 10.06.2003.
7. Маркелова Е.В., Костюшко А.В., Красников В.Е. Патогенетическая роль нарушений в системе цитокинов при инфекционно-воспалительных заболеваниях // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2008. № 3. С. 24–29.
8. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Ройтт А. *Иммунология / пер. с англ.* М.: Логосфера, 2007. 568 с.
9. Профилактика клещевого вирусного энцефалита. СП 3.1.3.23-52-08. М., 2008.
10. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма // *Цитокины и воспаление*. 2002. Т. 1. № 1. С. 9–16.
11. Meulen J., Sakho M., Koulemou K. et al. Activation of the Cytokine Network and Unfavorable Outcome in Patients with Yellow Fever // *Journal of Infectious Diseases*. 2004. No. 190. P. 1821–1827.
12. Rempel J.D., Murray S.J., Meisner J. et al. Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis // *Virology*. 2004. Vol. 5. P. 381–392.
13. Robertson S.J., Mitzel D.N., Taylor R.T. et al. Tick-borne flaviviruses: dissecting host immune responses and virus countermeasures // *Immunol. Res.* 2009. Vol. 43. P. 172–186.
14. Samuel M.A., Diamond M.S. Pathogenesis of west nile virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion // *Journal of Virology*. 2006. Vol. 80, No. 19. P. 9349–9360.
15. Winter P., Dung N.M., Loan H.T., et al. Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Humans with Japanese Encephalitis // *Journal of Infectious Diseases*. 2004. No. 190. P. 1618–1626.

Поступила в редакцию 14.12.2010.

CYTOKINE PROFILE AT EARLY STAGES OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS INFECTION IN VACCINATED AND UNVACCINATED PEOPLE

N.V. Kryilova, G.N. Leonova, E.V. Pavlenko
Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia)

Summary – The paper provides the comparative investigation of cytokine level in blood serum, and spontaneous and induced cytokine production in patients with short-term tick-borne encephalitis-related antigenemia, vaccinated and unvaccinated against the tick-borne encephalitis. At the early stage of the infection, the unvaccinated people had the content of pro-inflammatory cytokines increased, both *in vivo* and *in vitro*. The group of the vaccinated patients was characterized by the increased production of immunoregulatory cytokines. The high cytokine-producing activity of the peripheral blood cells in patients under examination detected at the early stage of the infection is one of the crucial factors for rapid elimination of the virus.

Key words: tick-borne encephalitis virus, cytokines.