

МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ПРОДУКЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IN VITRO В НОРМЕ И ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Русинова Т.В.

ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации», Краснодар, e-mail:rusinova.tv@mail.ru

Изучено влияние препарата ДНК позвоночных (Деринат) и синтетических CpG последовательностей на продукцию цитокинов IL-8 и IFN α клетками крови здоровых доноров и больных острыми инфекционными заболеваниями вирусной и бактериальной природы in vitro. Установлено, что Деринат и агонист TLR9 ODN2395 (CpG-ДНК) достоверно усиливают продукцию IL-8 и IFN α во всех исследуемых группах. Также проведено исследование влияния данных препаратов в условиях блокады TLR9 на продукцию цитокинов у больных острой вирусной инфекцией, результаты эксперимента дают основания полагать, что фрагменты ДНК позвоночных распознаются преимущественно посредством рецептора TLR9, хотя данный механизм может быть не единственным и частично обусловленным CpG-независимой активацией TLR9.

Ключевые слова: препараты нуклеиновых кислот, TLR9, механизм действия, CpG-ДНК, IL-8, IFN α .

EFFECTS OF NUCLEIC ACIDS AGENTS ON PRODUCTION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN NORMAL AND INFECTIOUS PROCESS IN VITRO

Rusinova T.V.

Kuban State Medical University, Krasnodar, e-mail:rusinova.tv@mail.ru

The effect of vertebrate DNA (Derinat) and synthetic CpG sequences on secretion of cytokines IL-8, and IFN α by blood cells in vitro on healthy donors and patients with acute infectious diseases of viral and bacterial was studied. It was established that Derinat and agonist TLR9 ODN 2395 (CpG-DNA) significantly increase the production of IL-8 and IFN α in all groups. It was also investigated influence these medications in TLR9 blockade on the production of cytokines in patients with acute viral infection, results of the experiment give grounds for assuming that DNA fragments of vertebrates are recognized mainly through the TLR9 receptor, although the mechanism may not be unique, and partly caused by the CpG TLR9-independent activation.

Keywords: nucleic acids agents, TLR9, mechanism of action, CpG-DNA, IL-8, IFN α .

Для формирования защитной реакции при проникновении патогена организм должен уметь распознавать некоторые микробные структуры и молекулы. Эти принципиально важные для выживания и вирулентности микроорганизмов структуры распознаются различными семействами эволюционно консервативных патогенраспознающих рецепторов (PRRs), которые инициирует сигнальный каскад, приводящий к транскрипции воспалительных цитокинов и хемокинов, привлекающих иммунные клетки, тем самым способствуя развитию и сохранению дальнейшей реакции адаптивного иммунитета [1, 11].

Широко известно, что ДНК бактерий (CpG-ДНК) распознаётся TLR-9 рецептором, который экспрессирует как иммунные, так и неиммунные клетки [5, 9, 10]. Несмотря на то, что основные принципы распознавания бактериальной ДНК через TLR-9 изучались на протяжении многих лет, сведения об активации TLR-9 при распознавании патогенов в условиях инфекционного процесса по-прежнему крайне ограничены. CpG-мотивы действуют

на клетки организма как «сигнал тревоги», активируя врожденный и приобретенный иммунитет и во много раз усиливая ответ организма даже на низкоиммуногенные антигены [5]. Известно, что распознавание и связывание TLR-9 CpG-мотивов ДНК бактерий синтетических лигандов к рецептору приводит к активации В-клеток, к усиленной секреции ряда интерлейкинов и интерферона- α и γ [1, 2, 4, 10].

В нейтрофильных гранулоцитах (НГ) человека CpG-ДНК активирует рецептор TLR9, который индуцирует экспрессию провоспалительного хемокина IL-8 [8], необходимого для усиленной миграции и дегрануляции НГ и усиления их фагоцитарной активности, то есть играет ключевую роль в активации фагоцитов [1, 3, 6].

Поскольку определение уровня содержания цитокинов позволяет глубже понять механизм патогенеза многих заболеваний, а также оценить эффективность иммунотропных препаратов, целью работы явилось определение возможных механизмов влияния синтетических неметилованных CpG-ДНК мотивов (коммерческий лиганд к TLR9) и фрагментов «нативной» ДНК позвоночных (иммуномодулятор Деринат) на уровень продукции *in vitro* IL-8 и IFN- α клетками цельной крови здоровых лиц, а также больных острой вирусной и бактериальной инфекцией.

Материалы и методы

В исследовании использована цельная кровь 55 человек с установленным диагнозом – острый бактериальный тонзиллит – (ОБТ; 25 человек), острая Эпштейн-Барр вирусная инфекция (ОЭБВИ; 30 человек) на основании клинико-лабораторных данных. Контролем служила цельная кровь 20 практически здоровых субъектов.

Цельную кровь здоровых добровольцев и пациентов с ОБТ и ОЭБВИ инкубировали с синтетическим агонистом TLR9 - ODN2395 («Invitrogen» LifeTechnologies, США), Деринатом («Техномедсервис», Россия), а также с забуференным физраствором (ЗФР) (группы сравнения) при температуре 37 °С, в течение 24 часов, в CO₂-инкубаторе «NewBrunswickScientificGalaxy 170S» (Великобритания), при моделировании блокады рецептора все пробы предварительно 1 час инкубировали с антагонистом ODN-TTAGGG. Используемый объем и концентрация агониста TLR9 ODN2395 и антагониста TLR9ODN-TTAGGG соответствовали рекомендациям производителя препаратов для экспериментов *in vitro* (5мкл на 1 мл крови, C = 500 мкмоль/л), для Дерината был произведен расчет с учетом средней терапевтической дозы, используемой в клинической практике *in vivo* (10 мкл на 1 мл крови, C = 30,82мкмоль/л). Для оценки продукции цитокинов *in vitro* использовали супернатанты, полученные центрифугированием после инкубации цельной стабилизированной крови здоровых лиц, а также больных острой вирусной и бактериальной инфекцией. Концентрацию IL-8 и ИНФа определяли методом иммуноферментного анализа

(ИФА) на анализаторе ASCENT (Финляндия) с использованием соответствующей тест-системы (ЗАО ВЕКТОР-БЕСТ, г. Ростов-на-Дону, Россия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel, StatPlus 2009 с применением непараметрических тестов Вилкоксона. Результаты представляли как медианас верхним и нижним квартилем ($Me(Q_1-Q_3)$). Различия определяли значимыми при $p < 0,05$, незначимыми – при $p > 0,10$; в промежуточных случаях ($0,05 < p \leq 0,10$) обнаруженные эффекты обсуждали как тенденции.

Результаты

Исследованиями установлено, что после инкубации цельной крови с ЗФР определяемый уровень IL-8 в контрольной группе составил в среднем 8,65 пкг/мл, а в группах с ОБВИ (в 1,3 раза) и ОБТ (в 1,9 раз) был выше по сравнению со здоровыми лицами (таблица 1). При инкубации клеток цельной крови с Деринатом отмечено усиление секреции IL-8 как у здоровых лиц (в 44,7 раза), так и при ОБТ (в 18,4 раза) и ОБВИ (15,56 раза). Аналогичные тенденции в виде увеличения содержания IL-8 выявлены при инкубации цельной крови с агонистом TLR9 (ODN2395) во всех группах исследования. При этом в группе контроля и в группе ОБВИ синтез IL-8 был более интенсивно индуцирован именно Деринатом, в группе с ОБТ Деринат и агонист действовали с одинаковой интенсивностью.

Таблица 1

Влияние Дерината и агониста TLR9 (ODN2395) на продукцию IL-8 клетками крови больных острой вирусной и бактериальной инфекцией в условиях *in vitro* (в пкг/мл)

Группа	ЦК+ЗФР	ЦК+Деринат	ЦК+ ODN2395
Контроль (здоровые), n=20	8,65(6,24-13,97)	386,90 (297,87-594,10) p₁₋₂= 0,0431	174,70(112,75-250,90) p₁₋₃= 0,0431
ОБТ, n=25	16,81(13,02-20,85)	309,23(167,30-467,20) p₁₋₂= 0,0033	360,50(186,22-432,97) p₁₋₃= 0,0033
ОЭБВИ, n=30	11,23(10,51-49,01)	174,80(118,85-428,87) p₁₋₂= 0,0431	76,29(48,37-120,30) p ₁₋₃ = 0,0796

Примечание: ЦК – цельная стабилизированная кровь; ODN2395 – агонист TLR9; ОБТ – острый бактериальный тонзиллит; ОБВИ – острая Эпштейн-Барр-вирусная инфекция.

p₁₋₂ – различия при сравнении проб, инкубированных с физиологическим раствором с пробами, инкубированными с Деринатом;

p₁₋₃ – различия при сравнении проб, инкубированных с физиологическим раствором с пробами, инкубированными с ODN2395.

Во всех исследуемых группах выявлены сходные тенденции, проявляющиеся в увеличении синтеза IFN α при инкубации проб с Деринатом и ODN2395. Влияние агониста ODN2395 на продукцию интерферона в группах с бактериальной и вирусной инфекцией примерно в два раза выше по сравнению с действием Дерината (в 1,92 раза и в 1,73 раза соответственно). В контрольной группе показатели данного цитокина незначительно выше при инкубации с Деринатом (таблица 2).

Таблица 2

Влияние Дерината и агониста TLR9 (ODN2395) на продукцию IFN α клетками крови больных острой вирусной и бактериальной инфекцией в условиях *in vitro* (в пкг/мл)

Группа	ЦК+ЗФР	ЦК+Деринат	ЦК+ ODN2395
Контроль (здоровые), n=20	0,93(0,86-1,19)	2,04(1,23-3,32) p₁₋₂= 0,0431	1,19(1,12-2,10) p₁₋₃= 0,0431
ОБТ, n=25	1,48(0,82-1,58)	1,64 (1,19-3,56) p₁₋₂= 0,0033	3,16(1,88-2,69) p₁₋₃= 0,0033
ОЭБВИ, n=30	1,25(0,69-1,70)	2,57(1,19-3,56) p₁₋₂= 0,0431	2,29(1,88-2,96) p ₁₋₃ = 0,0796

Примечание: ЦК – цельная стабилизированная кровь; ODN2395 – агонист TLR9; ОБТ – острый бактериальный тонзиллит; ОЭБВИ – острая Эпштейн-Барр-вирусная инфекция.

p₁₋₂ – различия при сравнении проб, инкубированных с физиологическим раствором с пробами, инкубированными с Деринатом;

p₁₋₃ – различия при сравнении проб, инкубированных с физиологическим раствором с пробами, инкубированными с ODN2395.

Для выяснения возможного участия паттерн-распознающего рецептора фагоцитов – TLR9 в иммунотропных эффектах нуклеиновых кислот был проведен эксперимент с оценкой уровня секреции клетками цельной крови пациентов с ОЭБВИ цитокинов (IL-8 и IFN α) в условиях блокады рецептора TLR9, для чего цельную кровь пациентов предварительно инкубировали с ODN-TTAGGG (антагонист рецептора). Показано, что в присутствии блокатора ODN-TTAGGG синтез IL-8 и IFN α клетками цельной крови больных с острой вирусной инфекцией не усиливается при их инкубации с Деринатом и с агонистом TLR9, что позволяет предложить TLR9-опосредованный механизм влияния препаратов нуклеиновых кислот (таблица 3).

Таблица 3

Влияние Дерината и агониста TLR9 (ODN2395) на продукцию IL-8 и IFN α в системе *in vitro* при острой вирусной инфекции в условиях блокады TLR9 его антагонистом (ODN-TTAGGG)

Циток ин,пкг\ мл	ЦК+ЗФР	ЦК+Деринат	ЦК+агонист TLR9	ЦК+антагонист TLR9+Деринат	ЦК+антагонист TLR9+ агонист
IL-8	11,23 (10,51-49,01)	174,80 (118,85-428,87) p₁₋₂= 0,0431	76,29 (48,37-120,30) p ₁₋₃ = 0,0796	43,56 (39,22-47,90) p₂₋₄= 0,0431	30,965 (23,4-38,5) p ₃₋₅ = 0,0796
IFN α	1,25 (0,69-1,70)	2,57 (1,19-3,56) p₁₋₂= 0,0431	2,29 (1,88-2,96) P ₁₋₃ = 0,0796	1,14 (0,84-1,44) p₂₋₄= 0,0431	1,19 (0,885-1,935) p ₃₋₅ = 0,0796

Примечание: ЦК – цельная стабилизированная кровь.

p₁₋₂ – различия при сравнении проб, инкубированных с физиологическим раствором с пробами, инкубированными с Деринатом;

p₁₋₃ – различия при сравнении проб, инкубированных с физиологическим раствором с пробами, инкубированными с ODN2395;

p₂₋₄ – различия при сравнении проб, инкубированных с Деринатом с пробами, предварительно инкубированными с антагонистом TLR9;

p₃₋₅ – различия при сравнении проб, инкубированных с ODN2395 с пробами, предварительно инкубированными с антагонистом TLR9.

Заключение

Выявлены особенности влияния препаратов нуклеиновых кислот на продукцию провоспалительных цитокинов (IL-8, IFN- α) у здоровых добровольцев, а также при острой вирусной и бактериальной инфекции на примере острой ЭБВИ и при остром бактериальном тонзиллите. Установлено, что натриевая соль ДНК позвоночных (Деринат) и агонист TLR9 ODN2395 (CpG–ДНК) достоверно усиливают продукцию IL-8 во всех исследуемых группах в системе *in vitro*, но в наименьшей степени – у пациентов с острой ВЭБ-инфекцией. Сходство направленности большинства иммуотропных эффектов Дерината и ODN2395 позволяет предположить TLR9-опосредованный механизм иммуотропных эффектов препаратов на основе нуклеиновых кислот и, в частности, Дерината. Между тем, имеющие место некоторые расхождения интенсивности действия Дерината и ODN2395, полученные при определении уровня IFN α в группе здоровых и больных субъектов, можно связать с отличием в строении сахарофосфатного остова у нативной и синтетической ДНК, так как

известно, что фосфотиоэфирные ODN имеют гораздо более высокое сродство к TLR9, чем ODN с естественной фосфодиэфирной связью [7]. Более достоверное заключение о механизме иммуотропных эффектов нуклеиновых кислот, полученное на примере продукции некоторых провоспалительных цитокинов, дают результаты проведенного исследования таковых в условиях блокады TLR9 *in vitro*. Результаты исследования дают основания полагать, что фрагменты ДНК позвоночных распознаются преимущественно посредством рецептора TLR9, хотя данный механизм может быть не единственным и частично обусловленным CpG-независимой активацией TLR9.

Список литературы

1. Арефьева Н.А., Азнабаева Л.Ф. Иммунология, иммунопатология, диагностика иммунных нарушений и их коррекция при заболеваниях верхних дыхательных путей // Российская ринология. – 2007. – № 3. – С. 11–14.
2. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С. Действие дезоксирибонуклеиновой кислоты прокариот на гуморальные и клеточные факторы врожденного и адаптивного иммунитета позвоночных // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. – № 3. – С. 8–12.
3. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Рубакова Э.И. Система цитокинов: учебное пособие. – М.: Янус-К, 2000. – 64 с.
4. Колесникова Е.В., Ханферьян Р.А., Куценко И.И. Цитокиновый профиль крови при различных вариантах течения хронической фетоплацентарной недостаточности // Российский иммунологический журнал. – 2011. – Т. 5 (14). – № 2. – С.140-145.
5. Goldfarb C.Y. et al. pG-C immunotherapeutic efficacy is jeopardized by ongoing exposure to stress: Potential implications for clinical use // Brain, Behavior, and Immunity. – 2011. – Vol. 25. – P. 67–76.
6. Grover S., Srivastava A., Lee R. et al. Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis // TherAdv Urol. – 2011. – Vol. 3. – No. 1. – P. 19–33.
7. Haas T., Metzger J., Schmitz F. et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation // Immunity. – 2008. – No. 28. – P. 315–323.
8. Levente J., Tarek Kh., Driss E.K., et al. Activation of TLR-9 Induces IL-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils // J Immunol. – 2006. – No. 176. – P. 1195–1202.
9. Moseman E.A., Liang X., Dawson A.J. et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells // J Immunol. – 2004. – No. 173 (7). – P. 4433–4442.

10. Ozcan E., Rauter I., Garibyan L. et al. Toll-like receptor 9, transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor, and CD40 synergize in causing B-cell activation// *J Allergy Clin Immunol.* – 2011. – No. 128 (3): P. 601–609.
11. Pandey S., Kawai T., Akira S. Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015. doi: 10.1101/cshperspect.a016246.