

УДК 57.084.1+578.74

## ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА ИНТЕРФЕРОНА, CD4 И CD8 Т ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ И СЕЛЕЗЕНКЕ МЫШЕЙ, ПЕРОРАЛЬНО ВАКЦИНИРОВАННЫХ “РАННИМ БЕЛКОМ” ВПЧ16 Е2

Член-корреспондент РАН Р. К. Салаяев<sup>1,2,\*</sup>, Н. И. Рекославская<sup>1,2,\*\*</sup>, А. С. Столбиков<sup>1,2</sup>

Поступило 08.05.2019 г.

Высокое содержание интерферона, CD4 и CD8 Т лимфоцитов обнаружено в крови и селезенке мышей, перорально вакцинированных “ранним” белком ВПЧ16 Е2 с помощью методов ELISPOT, Вестерн-блот-гибридизации и иммуноферментного анализа. Сделан вывод о том, что “ранний” белок ВПЧ16 Е2 принимает участие в активации иммунной системы в процессе контроля над патогенозом и неоплазией.

**Ключевые слова:** ВПЧ16 Е2, индукция иммунной системы мышей, интерферон, CD4 и CD8 Т лимфоциты, спленоциты, пероральная терапевтическая вакцина.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-5652488333-337>

Важную роль в организации защитного барьера для чужеродных микроорганизмов выполняют интерфероны, синтез которых резко возрастает в присутствии патогена, при этом происходит активация иммунной системы, препятствующей инфицированию организма, а также супрессия злокачественного роста клеток. Показано, что главную роль в этих защитных реакциях играет интерферонный сигналинг: существуют мембраносвязанные рецепторы интерферонов и путь сигнальной трансдукции JAK/STAT, включающий фосфорилирование специфической киназой и сигнальные транслокаторы/активаторы транскрипции, в результате чего происходит регуляция (стимуляция) нескольких сотен генов [1].

Индукция противоопухолевого ответа предполагает взаимодействие иммунных клеток в ответ на ранние признаки опухолевого роста клеток, а также на антигенные белки патогенов [2] при праймировании иммунных клеток, сопряженных с главными комплексами гистосовместимости класса I и класса II. В результате праймирования из незрелых (“наивных”) Т лимфоцитов формируются высокоспециализированные иммунокомпетентные CD4 (хелперы) и CD8 (киллеры) Т лимфоциты в костном мозге, печени и селезенке. Таким образом, интерфероны формируют противоопухолевый иммунитет через мобилизацию различных иммунных клеток. Но вследствие многочисленности эффектов действия интерферонов пока ещё неизвестно, каким образом интерферонный сигналинг контролирует опухолевый рост.

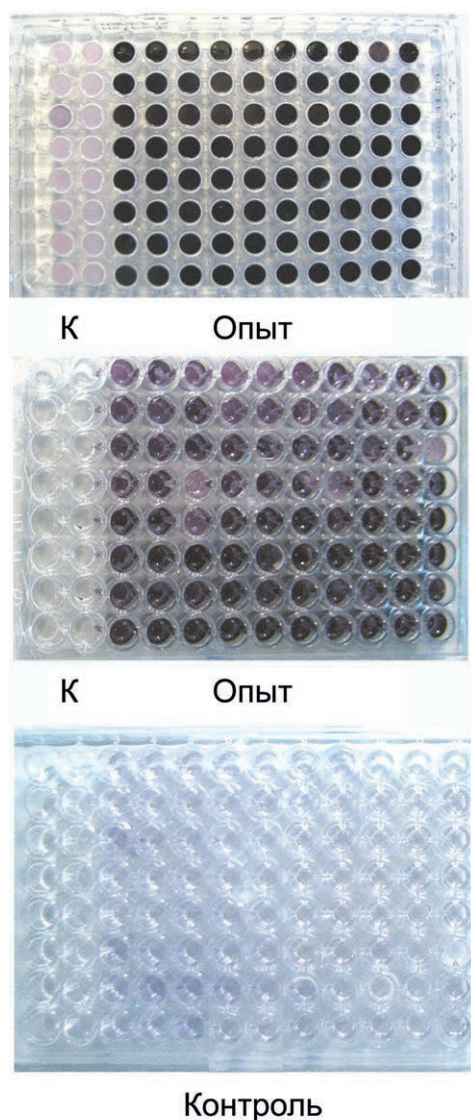
В работе [3] мы наблюдали регрессию опухолей семенников мыши, индуцированных инъекцией раковых клеток HeLa, в результате последующей пероральной вакцинации мышей антигенным “ранним” белком ВПЧ16 Е2 [3].

В задачу данной работы входило изучение содержания интерферона, а также CD4 и CD8 Т лимфоцитов в крови и селезенке мышей, инфицированных клетками HeLa, до и после перорального вакцинирования “ранним” белком ВПЧ16 Е2. Для решения этой задачи взрослых (возрастом 1 год) беспородных мышей вначале инъецировали суспензией клеток HeLa, а затем через 7 мес вакцинировали однократно вакцинным материалом плодов томата (500 мг антигенного белка ВПЧ16 Е2), полученного ранее опубликованным методом [4]. Через 7 сут у мышей брали кровь и изолировали селезенку. До начала экспериментов кровь содержали при –62 °С в низкотемпературном морозильнике. Спленоциты из селезенки выделяли рутинным способом, помещая её в среду DMEM без сыворотки эмбриона коровы, но с добавлением пенициллина 1000 ед/мл среды и 50 мг/л стрептомицина. Для этого соединительнотканную капсулу селезенки многократно прокалывали стерильной иглой одноразового шприца и вымывали спленоциты из селезенки этим же шприцем в среду DMEM. Данный способ является наиболее щадящим и позволяет получить 100% жизнеспособные спленоциты (тест на окрашивание трипановым синим – 0% мёртвых клеток). Окрашивание нитротетразолием синим выявило в препарате спленоцитов клетки с характерным для лимфоцитов моноклеарным строением: наличие большого ядра и узкой полосы цитоплазмы по периферии.

<sup>1</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений  
Сибирского отделения Российской Академии наук, Иркутск

<sup>2</sup> Иркутский научный центр Сибирского отделения  
Российской Академии наук

\*E-mail: [salyaev@sifibr.irk.ru](mailto:salyaev@sifibr.irk.ru)



**Рис. 1.** Содержание интерферона в сыворотке крови контрольных и вакцинированных ВПЧ16 Е2 мышей. Вверху – ELISPOT с сывороткой крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 Е2. К – “пустой” контроль без сыворотки, Опыт – опытный вариант. Средняя часть – Вестерн-блот-гибридизация с сывороткой крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 Е2. К – “пустой” контроль. Опыт – опытный вариант. Внизу – Контроль – Вестерн-блот-гибридизация с сывороткой крови контрольных мышей.

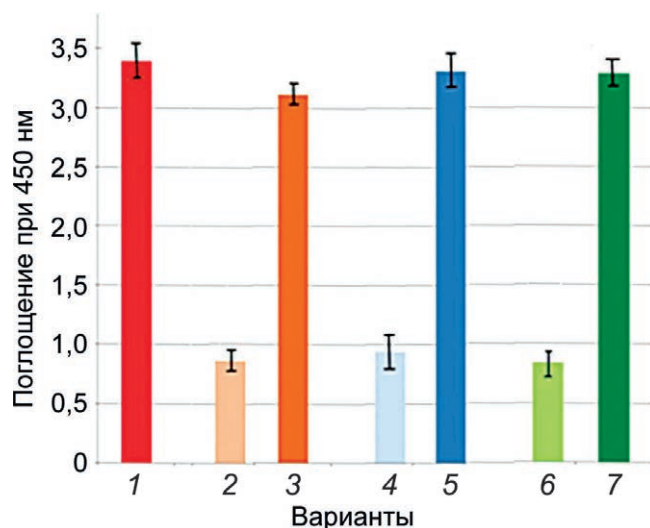
Полученную суспензию спленоцитов переносили в стерильные эппендорфы и центрифугировали 7 мин при 700g. Супернатант удаляли, полученный осадок ресуспендировали в 10 мл среды DMEM с добавлением антибиотиков и 1 мл раствора ВПЧ16 Е2 (10 мг). По 100 мкл суспензии вносили в лунки микропланшетов, в которые заранее были помещены диски нитроцеллюлозной мембраны. Для анализа интерферона применяли процедуру ELISPOT, используя набор Murine IFN $\gamma$  ELISPOT

Kit (with precoated plates) фирмы “Abcam” (Англия) с уже имеющимися в лунках дисками. Для анализа CD4 и CD8 Т лимфоцитов модифицировали метод ELISPOT, используя обычные микропланшеты фирмы “Медполимер” (Санкт-Петербург, Россия), помещая на дно их лунок нитроцеллюлозные диски (диаметром 4 мм). Суспензию спленоцитов (или сыворотку крови) в среде DMEM распределяли по лункам с нитроцеллюлозными дисками и оставляли на 3 сут при комнатной температуре. Затем лунки промывали три раза стерильным буфером PBS (20 mM Na $_2$ HPO $_4$ /KH $_2$ PO $_4$ , 10 mM KCl, 140 mM NaCl, pH 7,4) и добавляли растворы моноклональных кроличьих антител к CD4 [EPR19514] или антител к CD8 [EPR21789] фирмы “Abcam” (Англия). Далее процедуру Вестерн-блот-гибридизации проводили по протоколу ELISPOT, используя вторичные козы антитела к мыши, конъюгированные с щелочной фосфатазой (“Sigma-Aldrich”, США), и субстраты 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат и нитротетразолий синий (SIGMAFAST™ BCIP®/NBT) фирмы “SIGMA” (США). Контролем служили кровь и селезёнка мышей, не подвергавшихся каким-либо процедурам.

Часть суспензии спленоцитов сохранялась в среде DMEM до конца эксперимента. Анализ показал, что спленоциты были жизнеспособны даже через 6 дней после выделения.

На рис. 1 представлены результаты ELISPOT и Вестерн-блот-гибридизации, свидетельствующие о весьма высоком содержании интерферона в сыворотке крови вакцинированных ВПЧ16 Е2 мышей по сравнению с сывороткой крови контрольных. Можно видеть, что в контрольной сыворотке крови низкий уровень интерферона аналогичен “пустому” контролю без сыворотки крови. В вариантах с сывороткой крови вакцинированных мышей гибридизация антител к интерферону была весьма интенсивной. Таким образом, двумя независимыми методами (ELISPOT и Вестерн-блот-гибридизация) установлено весьма существенное увеличение содержания интерферона в крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 Е2.

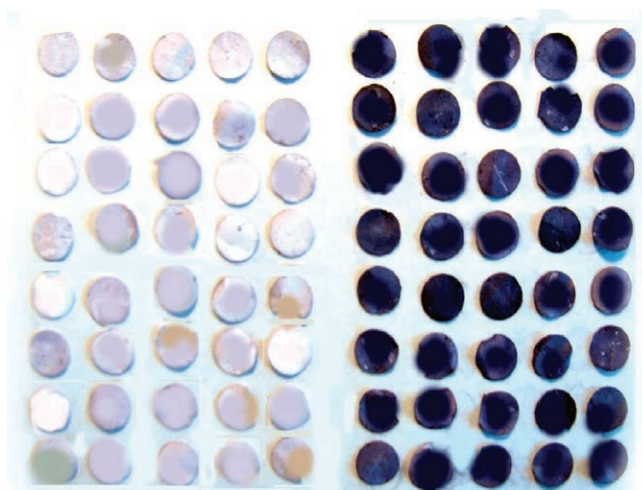
Количественное определение содержания интерферона в крови вакцинированных и контрольных мышей проводили иммуоферментным методом, используя калибровку на человеческий лейкоцитарный  $\alpha$ -интерферон (ФГУП НПО “Микроген” Минздрава России) и моноклональные крысиные антитела к  $\gamma$ -интерферону мыши [Gamma-Interferon antibody (IFN-g) [клон RMMG-1] фирмы “Abcam” (Англия).



**Рис. 2.** Иммуноферментный анализ содержания ( $N \pm m$ ) интерферона, CD4 и CD8 Т лимфоцитов в сыворотке крови контрольных и вакцинированных мышей. 1 – стандарт 62,12 МЕ/мл интерферона, 2 – контрольная сыворотка + антитела к интерферону, 3 – сыворотка крови мышей, вакцинированных антигенным белком ВПЧ16 Е2 + антитела к интерферону, 4 – контрольная сыворотка + антитела к CD4 Т лимфоцитам, 5 – сыворотка крови мышей, вакцинированных антигенным белком ВПЧ16 Е2 + антитела к CD4 Т лимфоцитам, 6 – контрольная сыворотка + антитела к CD8 Т лимфоцитам, 7 – сыворотка крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 Е2 + антитела к CD8 Т лимфоцитам.  $N = 80$  для каждого варианта.

На рис. 2 представлены три независимых эксперимента с разными образцами сыворотки крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 Е2. Как видно из рис. 2, содержание интерферона в крови вакцинированных мышей приближалось к значению стандартного раствора 62,12 МЕ/мл интерферона, что значительно выше контроля. Содержание CD4 и CD8 Т лимфоцитов было также высоко и существенно превосходило уровень в контроле. При этом содержание CD4 и CD8 Т лимфоцитов было примерно равным, т.е. иммунорегуляторный индекс соотношения CD4/CD8 равен 1, что является индикатором сохранения здоровья мышей после вакцинации антигенным белком ВПЧ16 Е2. Это также означает активацию иммунной системы и отсутствие иммунных дисфункций, например при истощении Т лимфоцитов, при старении или неоплазии. Такое существенное повышение интерферона, а также CD4 и CD8 Т лимфоцитов свидетельствует о мобилизации иммунных клеток и подготовке антипролиферативного ответа.

Селезёнка считается одним из главных иммунных органов, в котором сосредоточены до 25% и более лимфоцитов организма. Созревание, прайми-



**Рис. 3.** Вестерн-блот-гибридизация (ELISPOT в нашей модификации) спленоцитов с антителами на  $\gamma$ -интерферон мыши. Слева – препараты спленоцитов контрольных мышей, справа – препараты спленоцитов вакцинированных ВПЧ16 Е2 мышей.

рование и дифференцировка лимфоцитов может также происходить в селезёнке. Анализ содержания интерферона в спленоцитах проводили методом Вестерн-блот-гибридизации.

На рис. 3 представлены результаты гибридации спленоцитов мыши, вакцинированной 6 сут ВПЧ16 Е2, с антителами к интерферону.

Из рис. 3 видно, что уровень интерферона весьма высок в препарате спленоцитов по сравнению с контролем. Поскольку на протяжении эксперимента клетки сохранялись живыми, то, вероятнее всего, в них происходил индуцированный белком Е2 синтез интерферона.

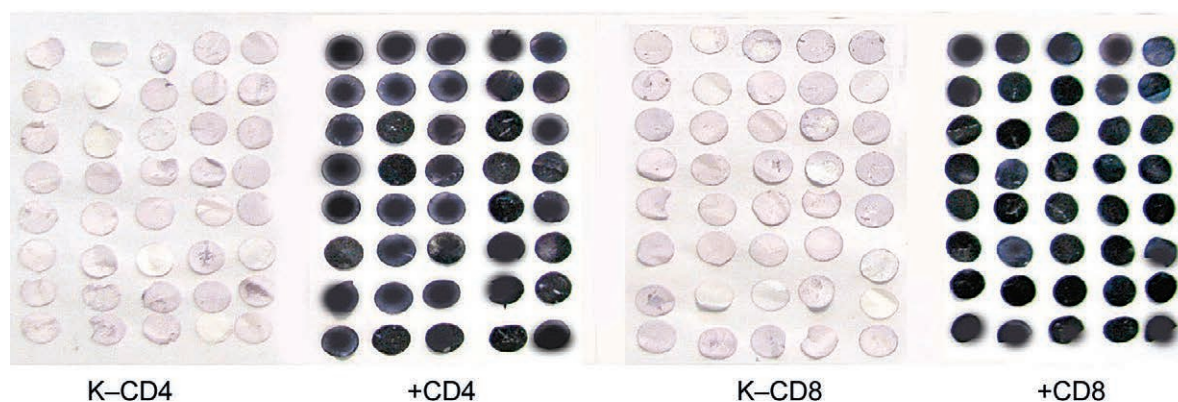
Поскольку в препаратах спленоцитов были видны мононуклеарные клетки, сходные с лимфоцитами, было целесообразным определить с помощью соответствующих антител, имеют ли эти клетки лиганды CD4 и CD8.

Мышей также вакцинировали в течение 6 сут ВПЧ16 Е2, а затем выделяли спленоциты из селезенки. Эксперимент с инкубацией спленоцитов в лунках проводили 6 сут на среде DMEM с антибиотиками и вносили стерильный раствор ВПЧ16 Е2 (500 мг в 10 мл воды).

Как видно из рис. 4, в препарате спленоцитов, содержащем также и лимфоциты, обнаруживались клетки с лигандами, имеющими сродство с антителами к CD4 и CD8 Т лимфоцитам.

Таким образом, по данным всех выполненных анализов гибридации с антителами (ИФА, ELISPOT и Вестерн-блот-гибридизация), подтвер-





**Рис. 4.** Вестерн-блот-гибридизация спленоцитов с антителами к CD4 и к CD8 Т лимфоцитам. К–CD4 – препараты спленоцитов контрольной мыши с антителами к CD4 Т лимфоцитам, +CD4 – препараты спленоцитов мыши, вакцинированной ВПЧ16 Е2, с антителами к CD4 Т лимфоцитам, К–CD8 – препараты спленоцитов контрольной мыши с антителами к CD8 Т лимфоцитам, +CD8 – препараты спленоцитов мыши, вакцинированной ВПЧ16 Е2, с антителами к CD8 Т лимфоцитам.

ждена активная индукция синтеза интерферона и формирование CD4 Т лимфоцитов (хелперов) и CD8 Т лимфоцитов (киллеров) в результате воздействия перорально введенной вакцины ВПЧ16 Е2.

Индукция синтеза интерферона в ответ на патоген достаточно хорошо изучена и определены рецепторы на мембране, а также известны пути сигнальной трансдукции, приводящей к активации сотен генов в ответ на увеличение содержания интерферона. Вместе с тем авторы отмечают [5], что существует достаточно сложная картина взаимодействий, которая может привести как к позитивным, так и к негативным последствиям активации интерферонстимулируемых генов. Одновременно происходит как антипролиферативное, так и пролиферативное действие в результате активации интерферонстимулируемых генов. Полагают, что в микроокружении опухолей (возможно, на ранних стадиях) присутствуют дополнительные факторы, определяющие выбор дальнейшего пути развития клеток, например прогрессия или регрессия опухолевого роста [2]. В связи с этим можно предполагать, что антигенный белок ВПЧ16 Е2 как блокатор экспрессии “ранних” генов папилломавируса может узнавать предопухолевые гены (протоонкогены) и надежно блокировать их экспрессию. Тогда вследствие ингибирования экспрессии “протоонкогенов” может произойти активация экспрессии генов, приводящих к индукции апоптоза опухолей. Таким образом, антигенный белок ВПЧ16 Е2 может осуществлять сортировку генов при инициации или регрессии опухолевого роста.

Подавление опухолевого роста (онколитическое действие) с помощью интерферонов является хорошо подтвержденным фактом, есть также свиде-

тельства прямой активации интерфероном апоптоза опухолевых клеток [6]. Но несмотря на сложность взаимодействия иммунных клеток при антипролиферативном сигнальном интерфероне, большинство исследователей склоняется к не прямому действию интерферона, а к косвенному через активацию клеток-медиаторов, обеспечивающих “надзор” над опухолевым ростом. Это осуществляется через праймирование иммунных клеток и мобилизацию компонентов главного комплекса гистосовместимости I и II классов, через индукцию природных киллеров (CD8 Т лимфоцитов), цитотоксических Т лимфоцитов и других иммунных клеток, обеспечивающих узнавание опухолевых клеток и их деградацию более надежным способом [7]. Можно полагать, что антигенный белок ВПЧ16 Е2 мог бы быть активным компонентом противоопухолевой иммунотерапии, развиваемой с использованием интерферона, при разработке терапевтических вакцин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garcia-Diaz A., Shin D.S., Moreno B.H., Saco J., et al.// Cell Reports. 2017. V. 19. № 6. P. 1189–1201.
2. Habib S., El Andaloussi A., Elmasry K., Handoussa A., et al.// Infection and Immunity. 2018. V. 86. № 6. e00019–18
3. Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S.// ДАН. 2019. V. 484. № 4. С. 503–506.
4. Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S.// ДАН. 2018. V. 482. № 5. P. 601–604.
5. Schneider W.M., Chevillotte M.D., Rice C.M.// Annu Rev. Immunol. 2014. V. 32. P. 513–545.
6. Kotredes K.P., Gamero A.M.// J. Interferon and Cytokine Research. 2013. V. 33. P. 162–170.
7. Muller L., Aigner P., Stoiber D.// Frontiers in Immunol. 2017. V. 8. Article 304.

## THE INDUCTION OF THE SYNTHESIS OF INTERFERON, CD4 AND CD8 T LYMPHOCYTES IN BLOOD AND SPLEEN OF MICE AFTER ORAL VACCINATION WITH THE “EARLY” PROTEIN HPV16 E2

Corresponding Member of RAS **R. K. Salyaev**<sup>1,2</sup>, **N. I. Rekoslavskaya**<sup>1,2</sup>, **A. S. Stolbikov**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation*

<sup>2</sup>*The Irkutsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation*

Received May 8, 2019

Very high contents of the interferon, CD4 and CD8 T lymphocytes were found in blood and spleen cells after the oral vaccination of mice with the “early” protein of high-risk oncogenic papillomavirus HPV16 E2 by using immunoassays analyses: ELISPOT for the detection of the content of interferon, Western-blot hybridization and enzyme immunoassays for analyses of CD4 and CD8 T lymphocytes. Both blood cells and splenocytes showed high content of alive mononuclear cells during ELISA and ELISPOT analyses that had very characteristic features for T lymphocytes. The ratio of CD4/CD8 was very close to 1 after the quantitative determination by the enzyme immunoassays with appropriate antibodies. It was concluded that the “early” protein HPV16 E2 participated in the activation of the immune system during pathogenesis and neoplasia.

**Keywords:** HPV16 E2, the induction of mice immune system, interferon, CD4 and CD8 lymphocytes, splenocytes, oral therapeutical vaccine.