

## МОНОМЕРНЫЙ АЛЛЕРГОИД ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ ИНДУЦИРУЕТ ЛОКАЛЬНЫЙ И СИСТЕМНЫЙ ТОЛЕРОГЕННЫЙ ОТВЕТ С УЧАСТИЕМ IL-10-ПРОИЗВОДЯЩИХ CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ

К. Петрарка<sup>1</sup>, Ф. Лаззарин<sup>1</sup>, Т. Паннеллини<sup>2</sup>, М. Йецци<sup>2</sup>, М. Брага<sup>3</sup>, Дж. Мистрелло<sup>4</sup>, П. Фаладжиани<sup>4</sup>, Л. Ди Джампаоло<sup>1</sup> и М. Ди Джиоаккино<sup>1,5</sup>.

1 - Отделение Аллергии и Иммунотоксикологии, Центр изучения старения (CeSi) на базе Университета «Габриэле д'Аннунцио», Кьети; 2 – Иммуно-онкологическое отделение, Центр изучения старения (CeSi), на базе Университета «Габриэле д'Аннунцио», Кьети; 3- Отделение Аллергии, Гражданский Госпиталь, Брешиа; 4 – Лофарма С.п.А., Милан;

5 – Факультет Медицины и Науки о Старении, Университет «Габриэле д'Аннунцио», Кьети, Италия

Эффективность сублингвальной иммунотерапии, которая в настоящее время является одним из методов лечения респираторной аллергии, зависит от толерантности, индуцируемой оральной мукозо-ассоциированной иммунной системой; однако, лимфоидная ткань кишечника (ЛТК: пейеровы бляшки и отдельные лимфоидные фолликулы) и кишечные лимфоузлы также могут играть большую роль, при их стимулировании проглоченной частью экстракта аллергена. Целью настоящего исследования является оценка того, индуцирует ли экспозиция аллергена применительно к ЛТК толерогенный ответ. С этой целью, мыши были сенсибилизированы овалбумином или Раg j 1 аллергенами. Соответствующие мономерные алергоиды, устойчивые к желудочному соку, вводились через орогастральный зонд. После лечения все мыши были обследованы на: сывороточный IgE, *in vitro* высвобождение Th1 и Th2 цитокинов аллерген-стимулированными лимфоцитами периферической крови, наличие CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Т-клеток в пейеровых бляшках, кишечных лимфоузлах и в селезенке. При сравнении с контрольной, сенсибилизированная группа показывает более высокий уровень сывороточного IgE, низкую частоту встречаемости CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Т-клеток на всех уровнях и большое количество *in vitro* высвобожденных IL-4, IL-6 и TNF- $\alpha$ . По сравнению с сенсибилизированной группой, высокая концентрация CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Т-клеток наблюдалась в селезенке обеих Раg j 1 и ОВА сенсибилизированной/пролеченной групп, и только для овалбумином пролеченных мышей в пейеровых бляшках и кишечных лимфоузлах IgE и *in vitro* цитокины были значительно ниже и эквивалентны контрольной группе. Результаты дали первые свидетельства того, что интрагастральное введение устойчивых к желудочному соку аллергенов восстанавливает местную и периферическую иммунологическую устойчивость аллерген-сенсибилизированных мышей.

При аллергии иммунные ответы характеризуются нарушением ингибирующей функции аллерген-специфических Т регуляторных клеток (T<sub>рег</sub>) и aberrантной активности Th2 клеток. Последние исследования на мышах и у людей выявили, что T<sub>рег</sub> клетки способны контролировать и/или ингибировать функцию Th1 и Th2 лимфоцитов, благодаря чему играют центральную роль в эффективном воздействии, производимом специфической иммунотерапией. Сублингвальная иммунотерапия (СЛИТ), которая интенсивно изучается в последнее время, демонстрирует восстановление системной переносимости, путем повторного включения T<sub>рег</sub> клеток, индуцирует периферийную («оральную») переносимость. При СЛИТ вакцина применяется сублингвально, находясь в ротовой полости не менее 2 минут. Затем экстракт аллергена проглатывается и попадает в кишечник. Последние исследования механизма иммунологической переносимости ясно продемонстрировали, что распознавание пищевых антигенов (пищевого или микробиологического происхождения) ограничивается иммунной системой ЖКТ, где оральная переносимость задает начало (5-6). Однако, не известно может ли проглоченная часть аллергена вызывать иммунологическую переносимость путем стимуляции лимфоидной ткани кишечника (ЛТК). У людей оральная иммунотерапия дает противоречивые и часто отпугивающие результаты (7-8), по всей видимости потому, что аллергены перевариваются желудочной кислотой и кишечными ферментами и теряют свой иммунный потенциал. С другой стороны, некоторые исследования на мышах

показывают, что добавление в пищу специфических аллергенов восстанавливает иммунную переносимость сенсibilизированных антигенов. Кроме этого, нельзя исключать, что этот толерогенный эффект может возникать благодаря контакту, который происходит у антигена со слизистой ротовой полости в период кормления.

Настоящая работа была проведена для проверки возможной иммунной активности проглоченных аллергенов, чтобы получить прямую стимуляцию ЛТК, избегая контакта аллергена со слизистой ротовой полости и выбрать аллерген для терапевтического применения, который сохраняет свои биохимические и иммунологические характеристики в ходе прохождения через желудочно-кишечный тракт. Для этих целей были выбраны мономерные алергоиды, химически модифицированные аллергены, так как, в отличие от нативных аллергенов, они устойчивы к воздействию желудочно-кишечных ферментов.

Для нашего исследования мы выбрали мономерные алергоиды протеина Par-j 1, мажорного аллергена *Parietaria judaica*, и овальбумина (ОВА), которые вводились через орогастральный зонд, для избежания контакта со слизистой ротовой полости.

Две группы мышей были сенсibilизированы Par j 1 или ОВА, после чего лечились путем интрагастрального введения соответствующих мономерных алергоидов.

В качестве показателей сенсibilизации и переносимости оценивались уровни IgE, распределение системных и местных (ЛТК) T<sub>рег</sub> клеток, и спектр цитокинов, секретируемых *in vitro* алерген-стимулированными мононуклеарными клетками периферической крови.

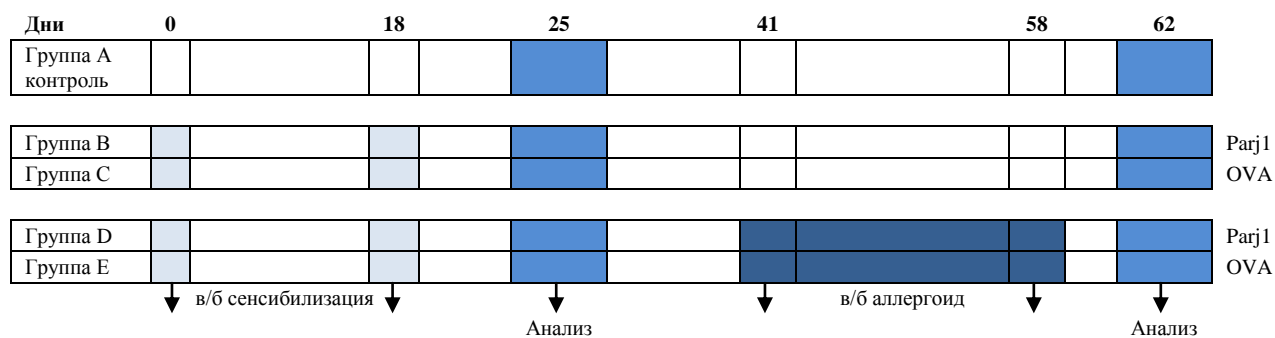
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Животные*

Тридцать здоровых Balb/c мышей (Чарлз Ривер, Милан, Италия) были размещены в ламинарном боксе, при заботливом обращении, осуществляемом в соответствии с ETS No. 123, статья 5. Штамм Balb/c был выбран для нашего исследования, поскольку характеризуется высоким уровнем T<sub>рег</sub> клеток и Th2-полярным иммунологическим профилем (12).

### *Протоколы сенсibilизации и лечения*

Две группы, по 12 мышей в каждой, были сенсibilизированы путем двух внутрибрюшинных (в/б) инъекций Par-j 1, 12 кДа, (Лофарма С.п.А., Милан, Италия) и ОВА, 43 кДа, (класс V, Сигма-Алдрич, Сент-Луис, Миссури, США), адсорбированных на Al(OH)<sub>3</sub>. Спустя 3 недели подгруппам из 6 мышей, от каждой сенсibilизированной группы, стали вводить через зонд внутрибрюшинно (в/б) 15 мкг Par-j1 или 40 мкг ОВА алергоидов (Лофарма С.п.А., Милан, Италия) ежедневно, на протяжении 18 дней. Концентрации Par-j и ОВА для сенсibilизации и лечения были определены на основании данных литературы (13-14). Группа А из 6 мышей (группа А) изучалась как контрольная, 3-ем из них делали в/б инъекции гидроксида алюминия, а 3-ех других оставили без обработки. На 25 день была проведена серия анализов крови. Через 4 дня после завершения в/б инъекций, все мыши были умерщвлены и для анализа у них взяты лимфоидные ткани, так называемые, пейеровы бляшки (ПБ), кишечные лимфоузлы (КЛ), селезенка (С) и кровь (см. рис. 1). Состояние всех животных из специфических групп было проанализировано по каждому параметру индивидуально.



**Рисунок 1.** Схема эксперимента по лечению и анализу. Мыши были разделены на следующие 5 групп, в соответствии с назначенным лечением: группа А: контрольные мыши, не сенсibilизированные и не пролеченные; группа В и группа С были сенсibilизированы Par-j 1 и Овальбумином (ОВА), соответственно, путем двух внутрибрюшинных (в/б) инъекций специфического алергена (на 0 и 18 день); группа D и группа E были сначала сенсibilизированы Par-j 1 и ОВА в соответствии с протоколом, аналогичным для групп В и групп С, на 0 и 18 день, а затем лечились соответствующими мономерными алергоидами ежедневно, с 41 по 58 день, путем внутрибрюшинного (в/б) введения специфических алергенов. Анализы выполнялись на 25 день (сывороточный IgE) и на 62 день (сывороточный IgE, CD4/25/IL-10 в Пейеровых бляшках, кишечных лимфоузлах и селезенке, а также высвобождение цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови)

#### Конечные уровни IgE

Образцы крови, по 200 мкл, были взяты из хвостовой вены на 25 день после сенсibilизации и на 62 день - сердечной пункцией. Итоговый сывороточный IgE выявлялся путем захвата анти-мышинным IgE и детекцией биотинилированного анти-мышинного IgE (БД Биосайенсес, Сан-Хосе, Калифорния, США).

#### Проточная цитометрия CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток и IL-10- CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>рег</sub> клеток

ПБ, КЛ и С были немедленно обработаны для получения суспензии одиночных клеток. После лизиса эритроцитов, лимфоидные клетки, в концентрации 1x10<sup>6</sup>, были инкубированы с фикоэритрином Су7-меченными моноклональными антителами к мышинным CD4 и с алофлоксаценом APC-меченными моноклональными антителами к мышинным CD25 или с флюорохром-конъюгированными изотипами контрольных антител. Для оценки внутриклеточного накопления IL-10, суспензии клеток сначала инкубировались с брэфелдином А (10 мкг/мл) в течение 6 ч. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> окрашенные клетки были зафиксированы и пермеабиллизированы с 8 % параформальдегидом и 1% бычьим сывороточным альбумином /0,1% сапонином фосфатно-солевым буфером и инкубированы с фикоэритрин-меченными анти-IL-10 (5мкг/мл) или с фикоэритрин-конъюгированными контрольными изотипами (5 мкг/мл). Клетки были анализированы проточной цитометрией с использованием цитометра BD FACSCalibur<sup>TM</sup> и программного обеспечения BD CellQuest<sup>TM</sup> (БД Биосайенсис, Сан-Хосе, Калифорния, США).

Для каждой пролеченной *in vivo* группы оценивалась частота встречаемости в клеточной ткани CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток и частота встречаемости IL-10-экспрессирующих CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток.

#### Вызванное алергеном продуцирование *in vitro* цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови

Мононуклеарные клетки периферической крови от каждой мыши культивировались (2,0x10<sup>6</sup> клетка/ячейка) в течение 72 ч при 37°C в присутствии 5 мкг/мл Par-j 1 или 100 мкг/мл ОВА, в зависимости от алергена, использованного для сенсibilизации, или без алергенов, для контроля.

Уровни цитокина в супернатанте были определены с использованием готового набора для мультиплексного хемилюминисцентного ELISA (Пирс, Рокфорд, Иллинойс,

США). Это сэндвич анти-мышинных цитокинов, включающий IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ .

Чувствительность ELISA была 12,5 пг/мл для IL-1 $\beta$ , 3,1 пг/мл для IL-4, 6,3 пг/мл для IL-5, 21,6 пг/мл для IL-6, 12,5 пг/мл для TNF- $\alpha$  и 31,3 пг/мл IFN- $\gamma$ . Статистический анализ был выполнен путем вычитания стандартных величин из показателей спонтанного, аллергеном стимулированного, высвобождения цитокинов.

#### *Статистический анализ*

Результаты представлены дескриптивной статистикой. Распределение величин рассматриваемых параметров в разных экспериментальных группах анализировались с помощью критерия суммы рангов Манна-Уитни и теста знаковых рангов Уилкоксона. Были выполнены как меж-, так и внутри-групповой анализ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

У мышей различных экспериментальных групп не было статистически значимых различий по весу (в среднем  $26,42 \pm 1,27$  г) и суммарному числу клеток ПБ, КЛ и С.

Средний вес селезенки составил 96 мг. Суммарное количество клеток в селезенке было  $13 - 15 \times 10^7$  клеток. Вес КЛ был 12 – 14 мг, а суммарное число лимфоидных клеток  $42-57 \times 10^5$  на мг ткани. Иммуногистохимический анализ всех исследованных лимфоидных тканей показал отсутствие структурных изменений у тестируемой группы, при сравнении с контрольной (данные не приводятся).

#### *Уровни сывороточного иммуноглобулина E*

На 25-й день исследования суммарный уровень сывороточного IgE у мышей сенсibilизированных Par-j 1 или ОВА был на 250-300% выше, чем у контрольных мышей (см. Таблицу 1).

На 62-й день, не выявлено значимых спонтанных изменений уровня сывороточного IgE у контрольной группы мышей (группа А) по сравнению с базовым уровнем, аналогично, в конце исследования у групп мышей В и С не выявлено изменений уровня IgE по сравнению с величиной, определенной после сенсibilизации (Таблица 1). С другой стороны, группы мышей D и E, которые получали в/б лечение, характеризовались значительным снижением уровней IgE ( $p < 0,01$ ), по сравнению со значениями, отмеченными на 25 день, а также со значениями уровней IgE, полученными у мышей из групп В и С ( $p < 0,01$ ) (Таблица 1).

**Таблица 1.** IgE у контрольных, сенсibilизированных и аллергеном леченных мышей.

	Контроль	Par-j 1 сенсibilизированные	Par-j1 сенсibilизированные без лечения	Par-j1 сенсibilизированные и пролеченные	ОВА сенсibilизированные	ОВА сенсibilизированные без лечения	ОВА сенсibilизированные и пролеченные
25 день	$68 \pm 22$	$200 \pm 40^*$	-	-	$180 \pm 35^*$	-	-
62 день	$70 \pm 12$	-	$210 \pm 19^*$	$80 \pm 15^{**}$	-	$228 \pm 25^*$	$90 \pm 30^{**}$

\*  $p < 0,01$ , при сравнении с не пролеченной группой; \*\*  $p < 0,01$ , при сравнении с сенсibilизированной группой

*Частота встречаемости CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> IL-10 Т клеток*

*Группа А: контрольные мыши.* Средняя частота встречаемости CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток в ПБ, КЛ и С была 2,02 %, 5,15% и 3,98 % от общего числа клеток, соответственно; доля клеток, которые экспрессируют IL-10, составляла 1,92 % в ПБ, 3,03 % в КЛ и 2,72 в С (Таблица 2). Таким образом, число IL-10 экспрессирующих клеток составило примерно 95 % в ПБ, 60 % в КЛ и 70 % в С от общего количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток. Эти параметры эквивалентны показателям описанным ранее у взрослых здоровых мышей того же штамма (Balb/c) (12).

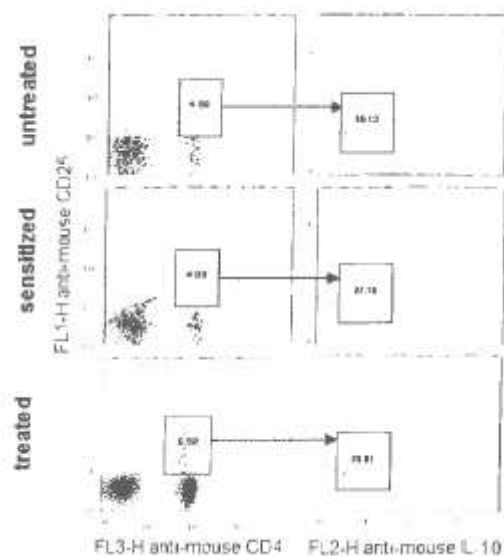
**Таблица 2.** Частота встречаемости CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток и IL-10-экспрессии CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т регуляторными клетками в лимфоидных органах.

		Группа А	Группа В	Группа D	Группа С	Группа Е
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (% от общего числа клеток)	ПБ	2,02 ± 0,23	3,20 ± 0,19*	3,82 ± 0,15*	1,03 ± 0,12*	6,51 ± 0,34*§
	КЛ	5,15 ± 0,23	9,12 ± 0,30*	8,03 ± 0,20*	7,32 ± 0,27*	7,81 ± 0,31*
	С	3,98 ± 0,42	5,16 ± 0,26*	6,02 ± 0,27*	6,10 ± 0,17*	4,97 ± 0,23*
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> (% от общего числа клеток)	ПБ	1,92 ± 0,34	1,01 ± 0,20*	0,52 ± 0,13	1,03 ± 0,12*	1,64 ± 0,24†
	КЛ	3,03 ± 0,32	2,44 ± 0,18	0,21 ± 0,10*	1,69 ± 0,21*	2,02 ± 0,17†
	С	2,72 ± 0,25	1,07 ± 0,15*	3,49 ± 0,35§	0,57 ± 0,18*	2,81 ± 0,22§

*Группа А: контрольная группа; группа В: Par-j 1 сенсibilизированная; группа С: ОВА сенсibilизированная; группа D: Par-j 1 сенсibilизированная/пролеченная; группа Е: ОВА сенсibilизированная/пролеченная*  
*ПБ – Пейеровы бляшки; КЛ – кишечные лимфоузлы; С – селезенка*

*Результаты выражены как среднее значение % от общего числа клеток ткани ± стандартная погрешность среднего значения (n = 6); \* p<0,05, при сравнении с группой без лечения; † p<0,05, при сравнении с сенсibilизированной группой; § p<0,02, при сравнении с сенсibilизированной группой.*

*Группы В и D: сенсibilизированные Par-j 1 и сенсibilизированные/пролеченные мыши.* Значительное увеличение общего числа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток было обнаружено в ПБ, КЛ, и С мышей из обеих групп В и D, при сравнении с контрольной группой (p<0,01), без существенных отличий между двумя группами (Таблица 2). С другой стороны, в селезенке частота встречаемости IL-10-экспрессирующих CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток была значительно ниже у мышей из группы В (сенсibilизирована Par-j 1) по сравнению с обеими контрольными группами (p<0,05 в случае % от общего числа клеток и p<0,02 в случае % от числа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток) и с группой D (p<0,05 в случае % от общего числа клеток и p<0,02 в случае % от числа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток) (Таблица 2). Не обнаружено статистической разницы по уровням CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> IL-10 Т клеток между группами мышей А и D (Таблица 2). Также в ПБ частота встречаемости этих клеток была ниже в группе В по сравнению с группой А (p<0,05), в то время как между группами В и D значительных изменений по частоте встречаемости клеток не обнаружено (Таблица 2). Наконец, значительное снижение количества IL-10-экспрессирующих CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т клеток (p<0,05) было обнаружено в КЛ мышей из группы D при сравнении как с КЛ мышей из группы контроля, так и из КЛ мышей из группы В. (Таблица 2). Точки диаграммы на рисунке 2 демонстрируют результаты цитофлюометрического анализа ex vivo суспензий клеток селезенки мышей, отражающие частоту встречаемости CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных Т клеток и частоту встречаемости подгруппы IL-10 экспрессирующих клеток в разных экспериментальных группах.



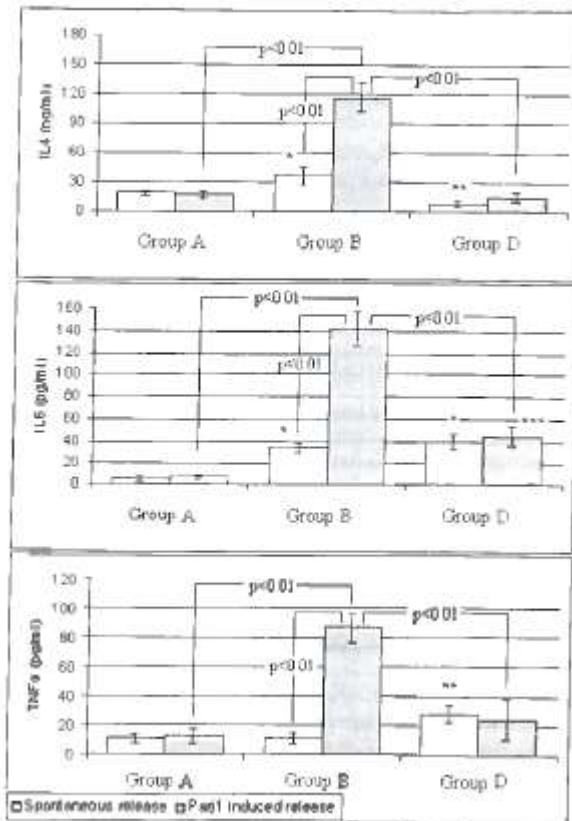
**Рисунок 2.** Точечная диаграмма цитофлуориметрического анализа *ex vivo* суспензии клеток селезенки от каждой мыши, показывающая частоту встречаемости  $CD4^+CD25^+$  регуляторных Т-клеток и частоту встречаемости подгруппы IL-10 продуцирующих клеток в разных экспериментальных группах Par-j 1

Группы С и Е: ОВА сенсibilизированные и сенсibilизированные/пролеченные мыши:  $CD4^+CD25^+$  Т клетки значительно чаще встречались в селезенке мышей из группы С, чем из группы Е ( $p < 0,05$ ), и в селезенке мышей из обеих этих групп, при сравнении с селезенкой мышей из группы А ( $p < 0,05$ ) (Таблица 2). И наоборот, этих клеток было значительно меньше в ПБ мышей из группы С по сравнению с ПБ мышью из группы контроля ( $p < 0,05$ ), так и с ПБ мышью из группы Е ( $p < 0,02$ ) (Таблица 2). Наконец, в КЛ мышей из обеих групп С и Е наблюдалось значительное повышение частоты встречаемости этих клеток по сравнению с КЛ мышью из группы А ( $p < 0,05$ ) (Таблица 2).

Аналогично с Par-j 1 сенсibilизированными группами, частота встречаемости  $CD4^+CD25^+$  IL-10 Т клеток в селезенке была значительно ниже в группе С по сравнению с контрольной ( $p < 0,05$ ) и с группой Е ( $p < 0,02$ ) (Таблица 2); количество этих  $T_{reg}$  клеток было схожим в группах А и Е; аналогичная картина обнаружена в ПБ: IL-10 экспрессирующих  $CD4^+CD25^+$  Т клеток было значительно меньше в группе С по сравнению с группой А ( $p < 0,05$ ) и группой Е ( $p < 0,05$ ), последние две группы имели схожее количество этих Т клеток (Таблица 2). В КЛ наблюдалось значительное различие в соотношении  $CD4^+CD25^+$  IL-10 Т клеток в группе С по сравнению с группой Е ( $p = 0,05$ ) (Таблица 2).

*Вызванное аллергенами производство цитокинов in vitro мононуклеарными клетками периферической крови цитокинов*

Значительной разницы между спонтанным и вызванным аллергеном высвобождением всех изучаемых цитокинов в группе А не обнаружено (см. Рисунок 3,4).



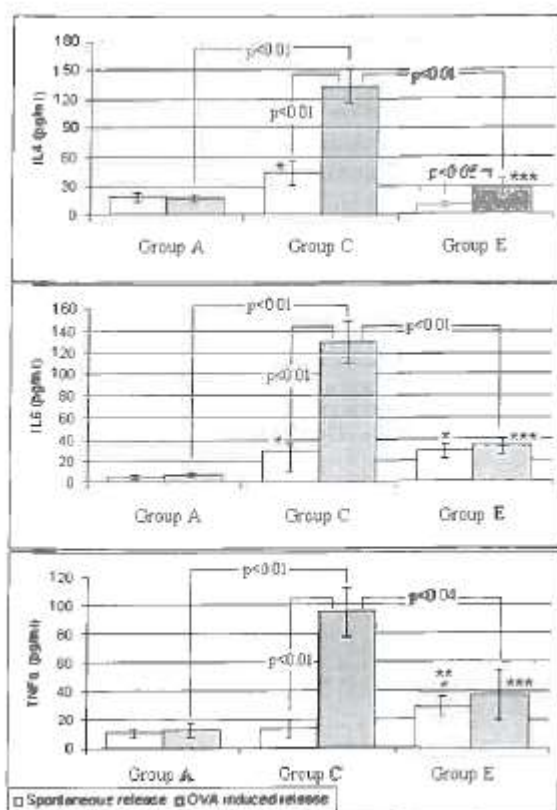
**Рисунок 3.** Высвобождение *in vitro* IL-4, IL-6 и TNF- $\alpha$  мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) Par-j 1 сенсibilизированных/пролеченных мышей. МКПК культивировались в течение 72 ч. в параллельных ячейках с или без Par-j 1 аллергенами, использованными для сенсibilизации. Спонтанное или вызванное аллергеном высвобождение цитокинов определялось в супернатанте мультиплексным ELISA методом. Спонтанное высвобождение IL-4 и IL-6 было значительно выше у сенсibilизированных мышей по сравнению с контрольной и сенсibilизированной/пролеченной группами, при значительно более низком уровне у сенсibilизированной/пролеченной группы по отношению к контрольной. Спонтанное высвобождение IL-6 было значительно выше у сенсibilизированной и сенсibilизированной/пролеченной групп по сравнению с контрольной и, наконец, спонтанное высвобождение TNF- $\alpha$  было значительно выше у сенсibilизированной/пролеченной группы по отношению как к контрольной, так и к сенсibilизированной группам. У сенсibilизированных мышей вызванное аллергеном высвобождение всех цитокинов было значительно больше, чем спонтанное, в то время, как не было выявлено значительной разницы у контрольной и сенсibilизированной/пролеченной группы мышей. Вызванное аллергеном высвобождение цитокинов было значительно выше у сенсibilизированных мышей по отношению к соответствующей величине у контрольных и сенсibilизированных/пролеченных мышей, со схожими уровнями цитокинов у этих последних групп, за исключением IL-6, который был значительно выше у сенсibilизированных/пролеченных мышей. Результаты были выражены как среднее значение уровней цитокинов  $\pm$  SD в культурах отдельных клеток от каждой группы мышей ( $n=6$ ).

\*  $p < 0,05$  по отношению к спонтанному высвобождению в контрольной группе; \*\*  $p < 0,05$  по отношению к спонтанному высвобождению в контрольной и сенсibilизированной группах; \*\*\*  $p < 0,05$  по отношению к вызванному аллергеном высвобождению в контрольной группе.

Группа A: контрольные мыши; группа B: мыши сенсibilизированные Par-j 1; группа D: сенсibilизированные Par-j 1 и пролеченные аллергенами мыши.

Спонтанное высвобождение IL-4 и IL-6 было значительно выше в группе B (сенсibilизированной Par-j 1) по сравнению с тем, что наблюдалось в группе A ( $p < 0,05$ ). Более того, в той же группе B вызванное аллергеном высвобождение IL-4, IL-6 и TNF- $\alpha$  было значительно выше ( $p < 0,01$ ) по сравнению с не стимулированными культурами (от  $34,5 \pm 9$  пг/мл до  $117,3 \pm 15$  пг/мл; от  $34,1 \pm 4,1$  пг/мл до  $142 \pm 16,7$  пг/мл; от  $12,5 \pm 4,4$  пг/мл до  $87,4 \pm 10,4$  пг/мл, соответственно) и с вызванным аллергеном высвобождением тех же

цитокинов в группе А и D (Рисунок 3). Схожие результаты были получены у ОВА-сенсibilизированных мышей, в группе С наблюдалось значительное увеличение количества IL-4, IL-6 и TNF- $\alpha$  у аллергеном стимулированных культур по сравнению с не стимулированными, и с группами А и Е (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Высвобождение *in vitro* IL-4, IL-6 и TNF- $\alpha$  мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) ОВА сенсibilизированных/пролеченных мышей. МКПК мышей культивировались в течение 72 ч. в параллельных ячеек с или без ОВА, использованном для сенсibilизации. Уровни спонтанного или вызванного аллергеном высвобождения цитокинов определялись мультиплексным ELISA методом. Спонтанное высвобождение IL-4 и IL-6 было значительно выше у сенсibilизированных мышей по сравнению с контрольной и сенсibilизированной/пролеченной группами, при схожих уровнях у сенсibilизированной/пролеченной и контрольной групп. Спонтанное высвобождение IL-6 было значительно выше у сенсibilизированной и сенсibilизированной/пролеченной групп по отношению к контрольной и, наконец, спонтанное высвобождение TNF- $\alpha$  было значительно выше у сенсibilизированной/пролеченной группы по сравнению с контрольной и сенсibilизированной группами. Вызванное аллергеном высвобождение всех цитокинов было значительно больше, чем спонтанное у сенсibilизированных мышей, и только в отношении IL-4 у сенсibilизированной/пролеченной группы. Вызванное аллергеном высвобождение цитокинов было значительно выше у сенсibilизированных мышей по отношению к соответствующей величине у контрольных и сенсibilизированных/пролеченных мышей, со значительно более высоким высвобождением у сенсibilизированных/пролеченных мышей по сравнению с контрольными. Результаты были выражены как среднее значение уровней цитокинов  $\pm$  SD в культурах одиночных клеток от каждой группы мышей (n=6).

$p < 0,05$  по отношению к спонтанному высвобождению в контрольной группе; \*\*  $p < 0,05$  по отношению к спонтанному высвобождению в контрольной и сенсibilизированной группах; \*\*\*  $p < 0,05$  по отношению к вызванному аллергеном высвобождению в контрольной группе.

Группа А: контрольные мыши; группа В: мыши сенсibilизированные ОВА; группа С: сенсibilизированные ОВА и пролеченные аллергенами мыши.

Аналогично группе А, группы D и Е не показали значительного увеличения высвобождения всех цитокинов, вызванного аллергеном, по сравнению со спонтанным, за исключением группы Е, у которой количества IL-4 были значительно выше ( $p < 0,05$ ) в супернатантах аллерген-стимулированных культур по отношению к не стимулированным (Рисунок 4). Более того, абсолютное значение вызванного аллергеном высвобождения IL-



б в группе D и IL-4, IL-6 и TNF- $\alpha$  в группе E было значительно выше по сравнению с обнаруженным у контрольных мышей (Рисунок 4). Тем не менее, при рассмотрении нормализованных значений, высвобождение IL-4 в группе E было значительно выше по сравнению тем, что отмечено в группе A, с  $1,05 \pm 1$  пг/мл до  $18,3 \pm 4,1$  пг/мл.

Наконец, не было значимой разницы в концентрации спонтанного или вызванного аллергеном высвобождения и IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  и IL-5 среди различных экспериментальных групп (данные не приводятся).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование показало, что интрагастральное введение мономерного аллергоида вызывает у мышей системный толерогенный ответ, включая производство в селезенке CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>рег</sub> клетками IL-10 и высвобождение цитокинов в периферической крови, с различной индукцией иммунных изменений в ЛТК, по преимуществу в ПБ и КЛ, в зависимости от сенсibilизированного аллергена.

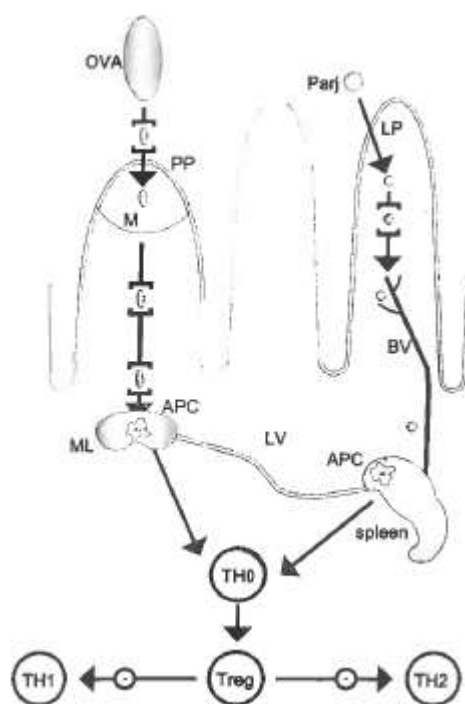
Сенсibilизация аллергеном в группах B и C привела к: а) возрастанию общего IgE в крови; б) сопутствующему уменьшению частоты встречаемости IL-10, экспрессируемого CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T клетками, во всех анализируемых лимфоидных тканях, по сравнению с контрольной группой, из чего можно заключить, что имела место местная и периферическая утрата переносимости сенсibilизированного аллергена; в) увеличению *in vivo* высвобождения IL-4 мононуклеарными клетками периферической крови, из чего можно заключить, что произошла активация периферических Th2-доминантных T-хелперных клеток.

Впоследствии, мышам в течение 18 дней вводились с помощью зонда мономерные аллергоиды сенсibilизированных аллергенов. Аллерговакцины обычно вводятся оральным путем, при соблюдении длительного контакта со слизистой ротовой полости – не менее 2 минут. В слизистой ротовой полости аллерген захватывается и обрабатывается дендритными клетками, что приводит к преобразованию резидентных CD4<sup>+</sup> T клеток в антиген специфические CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>рег</sub> (3,15) и IFN- $\gamma$ / IL-10-продуцирующие T клетки в дренирующих лимфатических узлах (16), что, в свою очередь, подавляют функцию эффекторных Th2 клеток путем секреции ингибирующих цитокинов IL-10 и TGF- $\beta$ , также как через межклеточные контакты (17).

Затем, экстракт аллергена проглатывается, но в литературе нет данных об иммунном потенциале проглоченной порции аллергена. Как указывалось выше, у людей оральная аллергенная иммунотерапия, полагающаяся на стимуляцию ЛТК, дает противоречивые, часто отпугивающие результаты (7 – 8), и одним из возможных объяснений этому, может быть то, что проглоченные аллергены перевариваются желудочной кислотой и кишечными ферментами, вследствие чего, теряют свой иммунный потенциал. Поэтому в настоящем исследовании вводились мономерные аллергоиды вместо нативных аллергенов, поскольку они, фактически, не изменяются при адсорбции (11), что описано для Par-j 1 (10). Мономерные аллергоиды - это химически модифицированные аллергены, созданные с целью получения улучшенных молекул (10) с высокой эффективностью и безопасностью для профилактической и терапевтической СЛИТ (18 – 19).

В нашем исследовании оба Par-j 1 и ОВА аллергоида вызвали системные эффекты со значительным уменьшением в сыворотке IgE, уменьшением продукции IL-4 и увеличением IL-10 экспрессирующих CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T лимфоцитов, демонстрируя иммуногенную активность проглоченных аллергоидов. Возрастание IL-10 экспрессирующих CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T лимфоцитов также наблюдалось в ПБ и КЛ сенсibilизированных мышей, пролеченных ОВА аллергоидами, но не наблюдалось у мышей, пролеченных Par-j 1 аллергоидами. Это различие может быть объяснено тем, что Par-j 1 и ОВА могут иметь нижеперечисленные различия в способе приема и усвояемости

из-за разных биохимических и иммуногенных характеристик. Они могут индуцировать подгруппы Т клеток не экспрессирующих ИЛ-10 (не оценивалось в этом исследовании) и/или  $T_{reg}$  клеток, экспрессирующих другие рецепторы хемокинов, и достигающих цели другими путями (21-22). Исключительное вовлечение селезенки у Par-j 1 пролеченных мышей может быть объяснено тем, что благодаря маленькому размеру Par-j 1 (12 кДа) может проникать через кишечный эпителий и попадать прямо в кровоток, минуя М-клетки (5), попадая непосредственно через общую циркуляцию в селезенку (Рисунок 5): эпителиально-клеточный путь проникновения описан у Майера (Mayer) в «Nature Review Immunology» (23).



**Рисунок 5.** Путь к оральной переносимости для ОВА и Par-j 1 аллергенов. ОВА антигены могут преодолевать эпителиальный барьер кишечника через Пейеровы бляшки, путем взаимодействия с антиген-презентирующими клетками и перемещением в кишечные лимфатические узлы; Par-j 1, имея небольшой молекулярный вес (12 кДа по сравнению с 69 кДа ОВА), может быть обработан и презентован молекулами главного комплекса гистосовместимости эпителиальных клеток кишечника или напрямую через эпителий, где он абсорбируется капиллярами, которые впадают непосредственно в систему циркуляции крови. Каждый из этих путей в конечном итоге сходится в селезенке. АПК клетки стимулируют пролиферацию и дифференциацию Th0 в T регуляторные клетки, которые ингибируют клетки Th1 и Th2. (1)

ML - кишечные лимфоузлы (КЛ); BV- кровеносные сосуды; LV- лимфатические сосуды; APC – антиген презентующие клетки (АПК); ОВА – овальбумин; PP – Пейеровы бляшки; LP (Lamina propria) - собственная пластинка слизистой оболочки кишечника; М – М-клетки.

Абсорбированные антигены могут преодолевать эпителиально-клеточный барьер кишечника прямо сквозь эпителий. Из слизистой оболочки кишечника они абсорбируются в капилляры, которые впадают в воротную вену и в печень (главную в индукции толерантности) и переносятся системой кровообращения в селезенку (23). Альтернативно, другим важным портом проникновения для антигенов является ПБ. Вместе с тем, хотя ранние исследования поддерживали роль ПБ в индукции переносимости (24), более новые исследования поставили под сомнение эту концепцию. М-клетки специализированы для захвата частиц антигенов, в то же время, презентация пептидов, орально введенных растворимых антигенов, случается и в отсутствие ПБ. В этом случае толерантность может сформироваться в КЛ, куда поступают антигены.

Пути, по которым антигены либо проникают через эпителий в капилляры крови, либо переносятся фагоцитами в КЛ через лимфатические протоки (передаются через М-

клетки или дендритные клетки), в конечном счете, сходятся в селезенке и определяют селезенку в качестве потенциального места для индукции толерантности.

Анализ *in vitro* вызванного аллергеном высвобождения цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови, подтверждает представление о том, что Th2 зависимые цитокины, такие как IL-4, у сенсibilизированных мышей активируются, а после лечения алергоидами ослабляются, таким образом происходит восстановление переносимости к сенсibilизированному алергену.

Вызванное алергеном высвобождение IL-6 значительно различается у мышей с разными способами лечения, с увеличением этого цитокина ассоциируется понижение частоты встречаемости  $T_{reg}$  клеток. Действительно, подача сигналов IL-6 в T-клетки становится ключевым моментом для блокады развития адаптивных  $T_{reg}$  клеток, для изменения баланса соотношения числа эффекторных и регуляторных T клеток.

Существенные изменения числа TNF- $\alpha$  в наших экспериментах нелегко объяснить, действительно, TNF- $\alpha$  является плейотропным цитокином, который может иметь про-воспалительные или иммуносупрессивные эффекты, в зависимости от среды, длительности экспозиции или болезненности состояния. Некоторые авторы считают эти цитокины потенциальными активаторами  $T_{reg}$  клеток (27), в то время, как другие описывают отсутствие  $T_{reg}$  экспрессии и функции в зависимости от наличия TNF- $\alpha$  и других растворимых медиаторов воспаления (28).

Наше исследование показало, что концентрация IFN- $\gamma$  не меняется у различных групп мышей. Это подтверждает, что изменения количества IFN- $\gamma$  могут иметь место на более поздних фазах алергенной СИТ, будучи сниженным под действием  $T_{reg}$  клеток на первой фазе лечения, позже производство IFN- $\gamma$  активируется обоими Th1 и Th2 цитокинами (29 – 30).

Настоящее исследование впервые получило свидетельства того, что проглоченная часть алергоида, используемая для СЛИТ, может подавлять *in vitro* продуцирование алерген-специфических цитокинов и ответы T-клеток, что сопровождается супрессией производства IgE. Эти открытия означают, что иммуногенность мономерных алергоидов обусловлена активацией как сублингвальной иммунной системы, так и ЛТК.