

УДК 604.4; 619:616.9; 619:577.27

Л. А. БАРАНОВА<sup>1</sup>, И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ<sup>1</sup>, Д. С. БОРИСОВЕЦ<sup>2</sup>, П. А. КРАСОЧКО<sup>2</sup>

### АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ТЕЛЯТ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНОЙ «БелВироПаст»

<sup>1</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: r344@ibp.org.by

<sup>2</sup>Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелецкого,  
Минск, Беларусь, e-mail: borisovets\_biev@mail.ru

Проведен скрининг структурных белков патогенных бактерий и анализ экспрессии генов – маркеров иммунного ответа лимфоцитов животных, иммунизированных инактивированной вакциной «БелВироПаст» для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и пастереллеза крупного рогатого скота. Показано, что вакцинирование приводит к активации иммунной системы организма животного, о чем свидетельствует увеличение уровня экспрессии генов, регулирующих иммунный ответ. Согласно полученным данным, разработанная вакцина может быть использована для специфической профилактики вирусно-бактериальных респираторных заболеваний телят.

**Ключевые слова:** бактерии *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, иммуноблоттинг, ПЦР, экспрессия, праймеры, технология Taqman.

L. A. BARANOVA<sup>1</sup>, I. D. VOLOTOVSKI<sup>1</sup>, D. S. BORYSOVETS<sup>2</sup>, P. A. KRASOCHKO<sup>2</sup>

### ANALYSIS OF THE CYTOKINES EXPRESSION IN IMMUNIZATION VACCINE-INACTIVATED CALF BY MEANS “BelViroPast”

<sup>1</sup>Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Belarus, e-mail: r344@ibp.org.by

<sup>2</sup>S. N. Vyshellesski Institute of Experimental Veterinary, Minsk, Belarus, e-mail: borisovets\_biev@mail.ru

The screening of the structural proteins of pathogenic bacteria and analysis of gene expression markers of the immune response of lymphocytes of animals in the presence of inactivated vaccine for prophylaxis of bovine infectious rhinotracheitis, bovine viral diarrhoea, parainfluenza-3 and pasteurellosis of cattle “BelViroPast” was carried out. It was shown that vaccination causes activation of the immune system of the animal, as evidenced by an increase in the level of expression of genes that regulate the immune response. The findings are proof that the developed vaccine may be used for specific prevention viral and bacterial respiratory diseases of calves.

**Keywords:** bacteria *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, immunoblotting, PCR, expression, primer, technology Taqman.

**Введение.** В структуре заболеваний крупного рогатого скота (КРС) заболевания вирусной этиологии у молодняка занимают одно из ведущих мест. В этиологической структуре респираторных заболеваний телят наибольшее значение играют вирусы инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3, а также пастереллы и мангамии.

Инфекционный ринотрахеит КРС характеризуется поражением верхних дыхательных путей и конъюнктивитом. Результаты проведенных ранее исследований показали, что инфекционный ринотрахеит встречается у 61–65 % коров и у 45–60 % телят. Вирусная диарея КРС – контагиозная болезнь, встречающаяся преимущественно у молодых животных и характеризующаяся эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта. Имеются данные, что вирусная диарея встречается у 85–95 % коров и у 60–100 % телят. Парагрипп-3 КРС – остропротекающая контагиозная вирусная болезнь с поражением органов дыхания, характерная главным образом для телят. Установлено, что парагрипп-3 встречается у 45–55 % коров и у 50–60 % телят.

Особую роль в развитии патологии легких у жвачных животных играют вторичные бактериальные инфекции. Как правило, нормальная (условно-патогенная) микрофлора верхних дыхательных путей клинически здоровых животных (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* (типы А и Д), *Actinomyces pyogenes*, *Haemophilus somnus* и *Mycoplasma bovis*) вызывает развитие вторичных инфекций после действия вирусов. Молниеносность течения болезни, массовое заболевание телят до месячного возраста, обширные геморрагические поражения легких обусловлены паразитированием микроорганизма, известного в настоящее время как *Mannheimia haemolytica* (*Pasteurella haemolytica*). Данный микроорганизм является одним из наиболее важных респираторных патогенов домашних жвачных и вызывает острую пневмонию у молодняка и взрослых животных [1, 2].

В этой связи наиболее актуальными задачами являются разработка и внедрение в практику ветеринарии новых отечественных высокоэффективных средств специфической профилактики вирусно-бактериальных инфекций телят. Исследование экспрессии генов, участвующих в формировании иммунного ответа организма телят, важно при разработке средств специфической профилактики вирусно-бактериальных респираторных заболеваний и при оценке их эффективности.

Инактивированные вакцины, как известно, индуцируют преимущественно гуморальный иммунный ответ по Th2 типу вследствие экзогенной презентации антигенов [3]. Однако при использовании некоторых вакцин выявлена активация не только интерлейкинов, обуславливающих развитие гуморального иммунитета (И-1 $\beta$ , И-4, И-6, И-10), но и маркеров клеточного иммунитета (И-2, И-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), индуцирующих иммунный ответ по Th1 типу. Показано, например, что использование вакцины против клещевого энцефалита активирует цитокины, не типичные для индукции иммунного ответа по Th2 типу [4].

Интерлейкины, относящиеся к растворимым внутриклеточным медиаторам (цитокинам), играют ключевую роль в развитии иммунного ответа клетки. Интерлейкины И-2, И-8 и И-12 и TNF $\alpha$  относятся к провоспалительным цитокинам и участвуют в формировании воспалительного иммунного ответа [5]. Индукторами синтеза цитокина служат микробные компоненты и продукты. Было показано, что И-12 является ключевым цитокином для усиления клеточно-опосредованного иммунного ответа и инициации эффективной противоинойфекционной защиты против вирусов, бактерий, грибов и простейших [6]. Противовоспалительные цитокины И-10 и И-4, играющие большую роль в ограничении развития воспаления и поддержании гомеостаза при воспалительной реакции, как правило, подавляют синтез провоспалительных цитокинов [7]. Дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами играет ключевую роль в развитии аутоиммунных состояний, хронизации и прогрессировании воспалительных заболеваний [8].

Цель исследования – скрининг структурных белков патогенных бактерий и анализ экспрессии генов – маркеров иммунного ответа лимфоцитов животных, иммунизированных средством специфической профилактики вирусно-бактериальных респираторных заболеваний крупного рогатого скота.

**Объекты и методы исследования.** В качестве объектов исследования использовали штаммы бактерий *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* и лимфоциты крови КРС.

В качестве средства специфической профилактики вирусно-бактериальных респираторных заболеваний для иммунизации КРС использовали биопрепарат «Вакцина инактивированная для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и пастереллеза крупного рогатого скота («БелВироПаст») производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского».

Вакцину вводили телятам 8–12-, 30–35-дневного возраста и коровам в период сухостоя на базе двух животноводческих хозяйств: ОАО «Щомыслица» Минского района и СПК «Жуховичи» Кореличского района Гродненской области согласно представленной в таблице схеме.

С целью проведения анализа экспрессии генов – маркеров иммунного ответа лимфоцитов животных до введения, через 28 и 56 сут после первичной иммунизации у животных была взята кровь, которую стабилизировали гепарином.

**Схемы иммунизации биопрепаратом «Вакцина инактивированная для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и пастереллеза крупного рогатого скота» («БелВироПаст»)**

| Группа животных      | Животные                       | К-во голов | Доза и кратность введения вакцины                     |
|----------------------|--------------------------------|------------|---|
| Опытная группа 1     | Телята 8–12-дневного возраста  | 5          | 1,0 см <sup>3</sup> однократно                        |
| Опытная группа 2     | Телята 8–12-дневного возраста  | 5          | 1,0 см <sup>3</sup> двукратно с интервалом 21–28 дней |
| Опытная группа 3     | Телята 30–35-дневного возраста | 21         | 2,0 см <sup>3</sup> однократно                        |
| Опытная группа 4     | Телята 30–35-дневного возраста | 21         | 2,0 см <sup>3</sup> двукратно с интервалом 21–28 дней |
| Опытная группа 5     | Коровы в период сухостоя       | 9          | 3,0 см <sup>3</sup> однократно                        |
| Опытная группа 6     | Коровы в период сухостоя       | 11         | 3,0 см <sup>3</sup> двукратно с интервалом 21–28 дней |
| Контрольная группа 1 | Телята 8–12-дневного возраста  | 5          | Физ. раствор  |
| Контрольная группа 2 | Телята 30–35-дневного возраста | 6          | Физ. раствор  |
| Контрольная группа 3 | Коровы в период сухостоя       | 5          | Физ. раствор  |

Для определения специфичных белков в образцах бактерий *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* использовали аналитический метод Вестерн-блоттинга [9]. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле проводили в Tris-Glycine-SDS буферной системе.

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли на приборе TRANS-BLOT SEMIDRY BIO RAD. Исследуемые белки детектировали методом «сэндвича» с использованием антител. Для иммуноблоттинга в качестве первичных антител брали сыворотку переболевших пастереллезом животных с титром антител 5–6 log<sub>2</sub>. Взаимодействие с сывороткой проводили при 50-кратном разведении последней. В качестве вторичных антител использовали антивидовой конъюгат (моноклональные антитела к IgG КРС, меченные пероксидазой).

Получение лимфоцитов проводили согласно стандартной методике выделения мононуклеаров периферической крови в градиенте плотности смеси фиколл–урографин [10].

РНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью набора GeneJet RNA purification kit (Fermentas, Литва). Далее на приборе NanoDrop 2000 измеряли концентрацию РНК. Доведя концентрацию до 150 нг/мкл, на матрице РНК методом обратной транскрипции с oligo(dT) праймерами получали кДНК в соответствии с протоколом производителя (Fermentas). После синтеза кДНК концентрацию в образцах выравнивали по оптической плотности при λ = 260 нм.

Уровень экспрессии генов определяли по критерию транскрипции при проведении ПЦР в реальном времени. Для количественной оценки полученных результатов использовали технологию TaqMan, при которой применяют ДНК-зонды со встроенной флуоресцентной меткой в 5'-положении, гасителем флуоресценции в 3'-положении и фосфатной группой в 3'-положении.

**Результаты и их обсуждение.** Методом иммуноблоттинга был идентифицирован ряд специфических белков, характерных для данных бактериальных культур (рис. 1). Для *Pasteurella multocida* идентифицирован ряд иммуногенных белков. Среди них белок с молекулярной массой

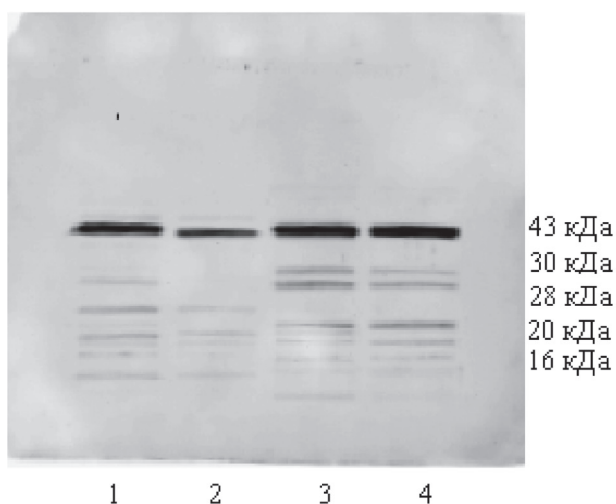


Рис. 1. Иммуноблоттинг белков *Pasteurella multocida* (1, 2) и *Mannheimia haemolytica* (3, 4)

16 кДа, гомологичный белку Р6 *Haemophilus influenzae*, широко распространенному среди всех соматических серотипов и вызывающему защитную иммунную реакцию при инфицировании животных [11]. Белок с молекулярной массой 30 кДа гомологичен липопротеину с молекулярной массой 28 кДа *Haemophilus influenzae* [12]. Он может рассматриваться в качестве кандидата на один из компонентов вакцин. Идентифицированы липопротеины с молекулярной массой 43 и 20 кДа, относящиеся к семейству глицерофосфодиэстераз. Липопротеин OmpA с молекулярной массой 28 кДа хотя и является поверхностным и антигенным белком, но не может быть использован в качестве иммуногена, поскольку использование его для вакцинации не обеспечивает полную защиту организма от бактериальной инфекции, вызываемой *P. multocida* [13].

Далее была исследована экспрессия генов цитокинов, участвующих, как известно, в индукции иммунного ответа при вакцинировании. Оценивали уровни экспрессии генов цитокинов И-2, И-4, И-10 и TNF $\alpha$  в образцах лимфоцитов телят после вакцинации биопрепаратом «БелВироПаст» против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, пастереллеза и мангамий.

Показано, что уровни экспрессии исследуемых интерлейкинов и TNF $\alpha$  изменяются у вакцинированных животных по сравнению с таковыми у контрольных животных (рис. 2). Установлено увеличение уровней экспрессии генов цитокинов И-2, И-4, И-10 и TNF $\alpha$  во всех группах вакцинированных животных. Наиболее значительное увеличение уровня экспрессии наблюдалось для И-10.

Активность цитокинов (И-2, И-4, И-10 и TNF $\alpha$ ) после иммунизации животных инактивированной вакциной «БелВироПаст» свидетельствует об активации макрофагов, Т- и В-лимфоцитов [14]. Активация И-2 и TNF $\alpha$  указывает на индукцию иммунного ответа по Th1 типу, что оказывается не типичным для очищенных белков, являющихся экзогенными антигенами, индуцирующими иммунный ответ по Th2 типу [4].

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при иммунизации инактивированной вакциной происходит активация транскрипции как генов интерлейкинов И-4, И-10, обеспечивающих гуморальное звено иммунитета по Th2 типу с участием Th2-хелперов, стимулирующих продукцию иммуноглобулинов, так и активация генов цитокинов И-2 и TNF $\alpha$ , индуцирующих иммунный ответ по Th1 типу с участием Th1-хелперов. Активация транскрипции мРНК И-4, И-10 в условиях организма стимулирует процесс выработки антител.

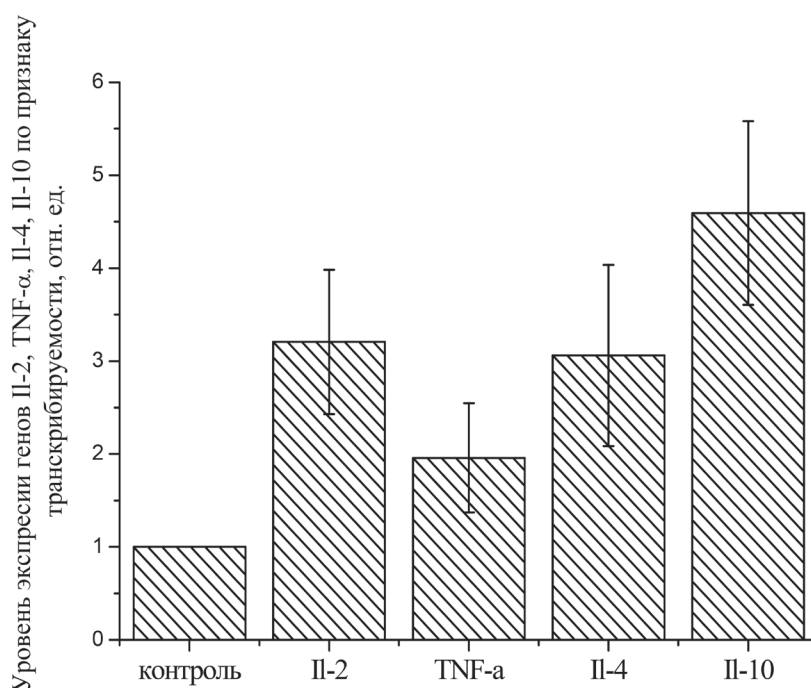


Рис. 2. Уровни экспрессии генов И-2, И-4, И-10 и TNF $\alpha$  в лимфоцитах после иммунизации инактивированной вакциной «БелВироПаст» для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и пастереллеза крупного рогатого скота. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SD,  $n = 3$

**Заключение.** Таким образом, при иммунизации животных инактивированной вакциной «БелВироПаст» для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и пастереллеза крупного рогатого скота активируется иммунная система организма животного, о чем свидетельствует увеличение уровня экспрессии генов, регулирующих иммунный ответ. Согласно полученным данным, разработанная вакцина может быть использована для специфической профилактики вирусно-бактериальных респираторных заболеваний телят.

### Список использованной литературы

1. Respiratory tract disease and mucosal colonization by *Pasteurella haemolytica* in transported cattle / G. H. Frank [et al.] // *Am. J. Vet. Res.* – 1996. – Vol. 57. – P. 1317–1320.
2. Brogden, K. A. *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats / K. A. Brogden, H. D. Lehmkuhl, R. C. Cutlip // *Vet. Res.* – 1998. – Vol. 29. – P. 233–254.
3. Сравнение экспрессии генов цитокинов у мышей, иммунизированных или зараженных вирусом клещевого энцефалита / О. В. Морозова [и др.] // *Интерферон-2011*: сб. ст. – 2012. – С. 461–465.
4. Игнатъев, Г. М. Активность цитокинов при иммунизации вакциной против клещевого энцефалита в эксперименте / Г. М. Игнатъев, М. С. Воробьева, Е. В. Отрашевская // *Вопр. вирусологии.* – 2003. – № 2. – С. 22–25.
5. Медуницын, Н. В. *Вакцинология* / Н. В. Медуницын. – М.: Триада-Х, 2004. – 446 с.
6. Lucey, D. R. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases / D. R. Lucey, M. Clerici, G. M. Shearer // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1996. – Vol. 9, N 4. – P. 532–562.
7. Koj, A. From the obscure and mysterious acute phase response to toll-like receptors and the cytokine network / A. Koj // *Curr. Immunol. Rev.* – 2008. – N 4. – P. 199–214.
8. Мордвинов, В. А. Цитокины: биологические свойства и регуляция экспрессии гена интерлейкина-5 человека / В. А. Мордвинов, Д. П. Фурман // *Вестн. ВОГиС.* – 2009. – Т. 13, № 1. – С. 53–67.
9. Burnette, W. N. Western blotting: Electrophoresis transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioactive detection with antibody and radioiodinated protein A / W. N. Burnette // *Anal. Biochem.* – 1981. – Vol. 112, N 2. – P. 195–203.
10. Индукция активных форм кислорода и структурная модификация мембран лимфоцитов человека под влиянием углеродных нанотрубок / Е. В. Жорник [и др.] // *Биофизика.* – 2012. – Т. 57, № 3. – С. 446–453.
11. *Pasteurella multocida* produces a protein with homology to the P6 outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* / R. W. Kasten [et al.] // *Infect. Immun.* – 1995. – Vol. 63. – P. 989–993.
12. Cooney, B. J. Three contiguous lipoprotein genes in *Pasteurella haemolytica* A1 which are homologous to a lipoprotein gene in *Haemophilus influenzae* type b / B. J. Cooney, R. Y. Lo // *Infect. Immun.* – 1993. – Vol. 61. – P. 4682–4688.
13. Characterization of, and immune responses of mice to, the purified OmpA-equivalent outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype A:3 (Omp28) / N. T. Gatto [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2002. – Vol. 87. – P. 221–235.
14. Игнатъев, Г. М. Продукция некоторых цитокинов при экспериментальной инфекции вирусом клещевого энцефалита у мышей / Г. М. Игнатъев, Е. В. Отрашевская, М. С. Воробьева // *Вопр. вирусологии.* – 2003. – № 1. – С. 18–21.

Поступила в редакцию 14.01.2016