

СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ *IN VITRO* ПРИ ИНФЕКЦИИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И В ПРИСУТСТВИИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ

М.В. Мезенцева, И.Ф. Антошина, О.В. Морозова

ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Клещевой энцефалит (КЭ) — нейроинфекционное вирусное заболевание, в патогенезе которого иммунные механизмы играют существенную роль. Проведен сравнительный анализ синтеза ключевых цитокинов при инфекции ВКЭ и в присутствии инактивированной вакцины против КЭ *in vitro*. При инфекции перевиваемой культуры клеток рака гортани человека Нер-2 ВКЭ наблюдали активацию транскрипции IFN α , IFN γ , IFN λ 1, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α и одного из факторов апоптоза Fas. Сравнение транскрипции и продукции цитокинов показало, что в результате вирусной инфекции баланс Th1/Th2 смещался в сторону Th1 на посттранскрипционном уровне. В присутствии инактивированной вакцины против КЭ, основанной на том же штамме Софьин ВКЭ, также происходила активация транскрипции цитокинов IFN α , IFN λ 1, IL-4, IL-10, как и в результате инфекции штаммом Софьин ВКЭ, а также продукция GM-CSF, что свидетельствует об индукции преимущественно Th2 пути. Впервые показано участие IFN III-типа (IFN λ 1) при инфекции культур клеток ВКЭ и добавлении вакцины против КЭ. Получены доказательства различия в динамике синтеза цитокинов IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α при инфекции ВКЭ, а также при действии инактивированной вакцины против КЭ.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, инактивированная вакцина клещевого энцефалита, цитокины.

Введение

Для специфической профилактики клещевого энцефалита (КЭ) в настоящее время в мире производят 7 вакцин, полученных инаktivацией формалином вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), из первичных культур фибробластов куриных эмбрионов, из которых 6 разрешены для применения в России.

Инактивированные вакцины, как известно, индуцируют преимущественно гуморальный иммунный ответ по Th2 пути вследствие экзогенной презентации антигенов [12]. Однако после иммунизации мышей вакциной против КЭ (ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Москва) выявлена активация не только интерлейкинов, обуславливающих развитие

гуморального иммунитета, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, но и маркеров клеточного иммунитета — IL-2, IL-12, TNF α , IFN γ . Активность цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF α и IFN γ) после иммунизации мышей инактивированной вакциной против КЭ свидетельствует об активации макрофагов, Т- и В-лимфоцитов [8], что не типично для очищенных белков, являющихся экзогенными антигенами и поэтому индуцирующих иммунный ответ по Th2 пути с секрецией IL-4 и IL-5, но не IFN γ [7].

Цель данной работы состояла в сравнительном анализе синтеза регуляторных цитокинов при инфекции, вызванной разными штаммами ВКЭ, и в присутствии инактивированных антигенов вакцины против КЭ *in vitro*.

Авторы:

Мезенцева М.В., д.б.н., зав. лабораторией культур тканей ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, Москва;

Антошина И.Ф., соискатель лаборатории культур тканей ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, Москва;

Морозова О.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, Москва.

Адрес для переписки:

Мезенцева Марина Владимировна
123098, Москва, ул. Гамалеи, 16, ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ.
Тел./факс: (499) 190-28-50 (служебн.); 8 916 126-24-20 (моб.).
E-mail: marmez@mail.ru

поступила в редакцию 10.02.2014
отправлена на доработку 12.02.2014
принята к печати 21.02.2014

© Мезенцева М.В., Антошина И.Ф.,
Морозова О.В., 2014

Материалы и методы

Клетки рака гортани человека HEP-2 (получены из музея клеточных культур ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, Москва) культивировали в среде ДМЕМ с L-глутамином в присутствии 10% телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС). После достижения клетками 90–100% монослоя добавляли вакцину против КЭ (ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Москва) цельную и в разведениях 1:10, 1:32, 1:100, 1:320, в соответствии с рекомендациями ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ. Анализ токсичности вакцины против КЭ производства ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН для клеток HEP-2 проводили с использованием превращения производного тетразола (МТТ) в ярко окрашенные соединения фармазана, количества которых оценивали спектрофотометрически.

Клетки HEP-2 инфицировали ВКЭ (100 TCID₅₀ штаммов Софьин и Айна 1448 из Государственной Коллекции Вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, Москва) 1 ч, затем клетки отмывали средой ДМЕМ без сыворотки и добавляли среду с 1% ТЭС, как описано ранее [13]. Персистентную инфекцию клеток HEP-2 оценивали посредством ИФА на антиген ВКЭ и ОТ-ПЦР в реальном времени [13, 26].

Экспрессию генов цитокинов (IFN α , IFN β , IFN γ , IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, TNF α) и факторов апоптоза (NF- κ B, Fas, Fas Ligand, Caspasa 3, Caspasa 8) оценивали по мРНК посредством обратной транскрипции с последующей ПЦР со специфическими праймерами (ЗАО «Синтол»), выбранными с использованием программного обеспечения (<http://medgen.ugent.be/rtpriimerdb>) с электрофоретической детекцией продуктов реакций.

Концентрации IFN γ и IL-4 определяли в динамике в культуральных жидкостях клеток HEP-2, инфицированных ВКЭ с помощью ИФА с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Продукцию Th1/Th2 цитокинов (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12(p70), IL-13, GM-CSF, IFN γ , TNF α) исследовали в культуральной жидкости клеток HEP-2 под действием вакцины против КЭ с помощью метода мультиплексного анализа с применением наборов фирмы Bio-Rad (США) на анализаторе «Bio-Plex 200» (Bio-Rad, США).

Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента, как описано [9]. Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При инфекции ВКЭ профили цитокинов отличаются от таковых в результате вакцинации из-за эндогенной презентации вирусных антигенов и индукции Th1-пути преимущественно

клеточного иммунитета. Известно, что на разных этапах инфекции ВКЭ у людей [2, 6, 15–17] и в экспериментах *in vivo* [19, 20] и *in vitro* [10, 18, 21, 24] синтез IFN α и IL-18 ингибируется и активизируется продукция IL-1, IL-4, IL-6, IL-8. При этом отмечено, что синтез IFN γ , IL-2, IL-12, TNF α — цитокинов, обуславливающих Th1-тип иммунного ответа, и IL-10, участвующего в образовании антител в ответ на вирус, может изменяться разнонаправленно в зависимости от стадии и клинической формы заболевания [3].

После заражения клеток HEP-2 штаммами ВКЭ дальневосточного (штамм Софьин) и сибирского (штамм Айна 1448) генетических типов, доминирующих в эндемичных областях России, значительного цитопатического действия не обнаружено [26], поэтому для детекции персистентной вирусной инфекции использовали методы иммуноферментного анализа на антиген ВКЭ с использованием тест-системы «Векто-ВКЭ антиген» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) и обратной транскрипции с последующей ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов в реальном времени [11].

Через 3–11 дней после инфицирования обнаружены РНК ВКЭ с пороговыми циклами в диапазоне от 23,76 до 46,23, что соответствовало 1–10⁵ геном-эквивалентов в реакционных смесях или 10⁻⁴-10⁻¹ вирионов на клетку, а также вирусный антиген с оптической плотностью при 450 нм от 0,397 до 0,527, что в соответствии с калибровочным графиком [13] соответствовал 1–2 нг/мл антигена Е ВКЭ. Принимая во внимание молекулярную массу гликопротеина Е ВКЭ около 60 kDa и количество 90 копий димера Е в каждом вирионе можно оценить количества до 10¹⁰ молекул антигена или до 5,6 × 10⁷ вирионов в 1 мл культуральной жидкости. Таким образом, совпадающие количественные оценки вирусных нагрузок при персистентной инфекции клеток HEP-2 разными штаммами ВКЭ на основании ОТ-количественной ПЦР в реальном времени и иммуноферментного анализа свидетельствовали о низкой множественности инфекции менее 1 вириона на клетку. Известно, что одна из стратегий вирусной инфекции состоит в снижении экспрессии вирусных генов и выхода внеклеточных вирионов [14]. Примером может служить персистентная инфекция клеток HEP-2 ВКЭ, для которой характерно присутствие 1 LD₅₀ ВКЭ, связанного с клетками, на 100 клеток, содержащих антиген [26], что соответствовало нашим количественным оценкам вирусных нагрузок посредством ОТ-ПЦР в реальном времени и ИФА на антиген.

В первые 3 дня инфекции наблюдали активацию экспрессии генов интерферонов I типа IFN α и IFN III типа IFN λ 1 (табл. 1), обладающих антивирусной активностью [3, 4]. При этом только в результате инфекции штаммом Со-

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ СИНТЕЗА РЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ В КЛЕТКАХ НЕР-2 ПРИ ИНФЕКЦИИ ВКЭ ШТАММЫ СОФЬИН, АЙНА 1448 И В ПРИСУТСТВИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КЭ

Цитокины	Изменение синтеза цитокинов в опыте по отношению к контролю <i>in vitro</i> (%±m%)			Литературные данные (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , у больных КЭ) [5–16]
	Вакцина (на основе штамма Софьин ВКЭ)	ВКЭ (штамм Софьин)	ВКЭ (штамм Айна 1448)	
IFN α	(10,5±4,09; p > 0,05) активация	(57,14±18,44; p < 0,05)* активация	(42,85±20,2; p > 0,05) активация	ингибирование
IFN λ 1	(26,67±9,83; p > 0,05) активация	(57,14±14,29; p < 0,05)* активация	(42,86±18,44; p > 0,05) активация	нет данных
IFN γ	(41,67±1,5; p < 0,001)* ингибирование/N	(28,57±10,2; p > 0,05) ингибирование/активация	(42,86±18,44; p > 0,05) ингибирование/активация	ингибирование/активация
IL-2	(41,67±10,28; p < 0,001)* ингибирование	(57,14±14,29; p < 0,05)* активация	(71,43±4,09; p > 0,01)* активация	ингибирование/активация
IL-12	(58,33±10,28; p > 0,05) ингибирование	(28,6±20,2; p > 0,05) активация	(71,43±4,09; p > 0,01)* активация	ингибирование/активация
TNF α	(10,5±4,09; p > 0,05) ингибирование	(57,14±18,44; p < 0,05)* активация	(85,71±0,9; p < 0,001)* активация	ингибирование/активация
IL-18	(6,67±1,83; p > 0,05), N	(7,43±4,44; p > 0,05), N	(7,43±4,44; p > 0,05), N	ингибирование
IL-4	(26,67±9,83; p > 0,05) активация	(51,43±18,44; p > 0,05) активация	(65,71±14,29; p > 0,05) активация	активация
IL-6	(7,5±1,1; p > 0,05), N	(2,86±0,2; p > 0,05), N	(2,86±0,2; p > 0,05), N	активация
IL-10	(34,17±10,39; p > 0,05) активация/N	(51,43±18,44; p < 0,05)* активация	(85,71±0,9; p < 0,001)* активация	активация/N
IL-1 β	(33,33±9,83; p > 0,05) ингибирование	(71,43±18,44; p < 0,01)* активация	(28,57±18,44; p > 0,05) активация	активация
IL-8	(8,33±1,28; p > 0,05) ингибирование	(51,43±18,44; p < 0,05)* активация	(85,71±0,9; p < 0,001)* активация	активация

Примечание: N — соответствует контрольной группе (клетки без ВКЭ и без вакцины); * — достоверные изменения (p < 0,001/ p < 0,05).

фьин ВКЭ экспрессию гена IFN λ 1 обнаруживали на протяжении 11 суток наблюдения, а второй пик экспрессии IFN α выявляли через 7–11 дней. Пик активности транскрипции и продукции IFN γ наблюдали в первые 4 суток инфекции ВКЭ (штаммы Айна 1448 или Софьин). И только штамм Айна 1448 ВКЭ вызывал повторный пик активности этого цитокина на 11 сутки наблюдения.

Таким образом, на начальном этапе инфекции выявлена активация 3 типов интерферонов: IFN α , но не IFN β , IFN γ и IFN λ — схожего по своим свойствам с IFN α , что соответствует данным для других вирусных инфекций [5]. Далее на 7–11 сутки заражения при воздействии ВКЭ штамма Софьин клетки НЕР-2 продуцировали IFN I–III типов, а ВКЭ штамм Айна 1448 индуцировал в клетках IFN II типа.

На протяжении 11 дней инфекции ВКЭ выявлена транскрипция генов IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α , необходимых для регулирования Th1/Th2 баланса и участвующих в дифференцировке Th1 и Treg лимфоцитов, а также макрофагов. Активная транскрипция IL-1 β под действием Айна 1448 отмечена на 4 и 11 дни, а под действием Софьин — чуть раньше: в первые 3 суток и на 7 день.

Отмечено, что при инфекции как штаммом Айна 1448, так и Софьин, активация экспрессии гена IL-4, принимающего участие в образо-

вании специфических антител, была выявлена с 2 по 7 дни, а увеличение синтеза белка этого цитокина — к 11 дню наблюдения, что показывает динамику дифференцировки клеток по Th2-типу.

Исследование влияния вакцины против КЭ ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН на синтез цитокинов и факторов апоптоза в клетках НЕР-2 показало (табл. 1), что в присутствии инактивированной вакцины, как и в процессе вирусной инфекции, в первые 2 суток происходила активация транскрипции генов цитокинов IFN α , IFN λ 1, IL-10, а также продукцию GM-CSF (p > 0,01) при отсутствии детектируемых изменений других цитокинов (IFN β , IFN λ 2 и IFN λ 3, IL-5, IL-6, IL-13, IL-17, IL-18) и факторов апоптоза в течение всего срока наблюдения. При этом под действием вакцины была отмечена тенденция к активации транскрипции IL-4 до 66,67±9,83% (p > 0,05). Однако продукция этого цитокина, как и IFN γ , оставалась на уровне контрольных значений то есть активация синтеза IL-4 блокировалась на посттранскрипционном уровне. В отличие от вируса, в течение первых 3 суток вакцина вызывала в клетках ингибирование экспрессии генов IFN γ (p < 0,001), IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12, TNF α , но продукция этих цитокинов не изменялась и регистрировалась на уровне контроля,

**ТАБЛИЦА 2. ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ТЕСТ
ВАКЦИНЫ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ФГУП
ПИПВЭ им. М.П. ЧУМАКОВА РАМН НА КЛЕТКАХ
HEp-2 МТТ-МЕТОДОМ**

Разведения вакцины	Среднее значение оптической плотности при длине волны 450 нм ($\pm m$ стандартная ошибка)
Цельная вакцина	0,62 \pm 0,04
1:10	0,82 \pm 0,19
1:32	0,85 \pm 0,04
1:100	0,99 \pm 0,05
1:320	1,17 \pm 0,12
Контроль клеток	0,68 \pm 0,02

что было обнаружено и рядом других авторов [1, 25]. Таким образом, в присутствии вакцины против КЭ ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН показана активация транскрипции мРНК IL-4, IL-10, участвующих в условиях организма в процессе выработки антител.

Показано, что исследуемая вакцина против КЭ не была токсична для клеток HEp-2 во всех исследованных концентрациях (цельная, 1:10, 1:32, 1:100, 1:320) (табл. 2).

Известно, что одной из причин нарушения существующего в норме баланса Th1- и Th2-лимфоцитов может являться нарушение реализации программы гибели иммунных клеток [22, 23]. Показано, что вакцина против КЭ не влияла на транскрипцию ряда факторов апоптоза. Отмечено, что при экспериментальной инфекции, вызванной ВКЭ (штамм Айна 1448 и штамм Софьин), был повышен FAS — один из основных

факторов, вызывающих апоптоз. При этом показано, что количество выработанного IFN γ преобладало над уровнем IL-4 под действием ВКЭ Софьин и Айна 1448 в 3,5 и в 2,9 раза соответственно. Это доказывает, что баланс Th1/Th2 цитокинов под действием вирусной инфекции, смешался в сторону Th1 на посттранскрипционном уровне. По литературным данным известно, что на ранней стадии инфекции ВКЭ активирует транскрипцию цитокинов, обуславливающих Th1 тип иммунного ответа в условиях организма [7], а при экзогенной презентации антигенов инактивированных вакцин показана индукция Th2 пути [13].

Заключение

Таким образом, при инфекции культуры клеток человека ВКЭ выявлена активация транскрипции генов IFN α , IFN γ , IFN λ 1, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12 и TNF α . При этом изменений экспрессии генов ряда цитокинов (IFN β , IFN λ 2 и IFN λ 3, IL-6, IL-17, IL-18) не обнаружено в течение всего срока наблюдений. В присутствии инактивированной вакцины происходила активация транскрипции генов цитокинов IFN α , IFN λ 1, IL-4, IL-10, а также продукцию GM-CSF. Впервые показано участие IFN III типа (IFN λ 1) при инфекции ВКЭ и в присутствии вакцины против КЭ. Получены доказательства различия в динамике синтеза цитокинов IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α при инфекциях, вызванных разными штаммами ВКЭ, а также при действии инактивированной вакцины против КЭ.

Список литературы

1. Авдеева Ж.И., Акользина С.Е., Алпатова Н.А., Никитина Т.Н., Рашепкина М.Н., Медуницын Н.В. Влияние цитокинов на иммуногенные свойства вакцины против клещевого энцефалита // Цитокины и воспаление. — 2009. — № 4. — С. 16–21.
2. Бондаренко А.Л., Тихомолова Е.Г., Зыкова И.В., Конякова Е.Л., Зянчурина Г.М. Прогностическое значение иммунорегуляторных Th1- и Th2-цитокинов при клещевом энцефалите // Инфекционные болезни. — 2011. — № 1. — С. 28–32.
3. Григорян С.С. Интерфероны лямбда (3-й тип интерферонов) и вирусные инфекции // Интерферон-2011: сб. науч. статей. — 2012. — С. 63–72.
4. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты (Справочник). — М.: Медицина, 1998. — 187 с.
5. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., Мезенцева М.В. Ранние цитокиновые реакции при вирусных инфекциях // Цитокины и воспаление. — 2004. — №3 (1). — С. 3–6.
6. Зима А.П. Система цитокинов и их рецепторов при хронических вирусных инфекциях: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Новосибирск, 2008. — 44 с.
7. Игнатъев Г.М., Воробьева М.С., Отрашевская Е.В. Активность цитокинов при иммунизации вакциной против клещевого энцефалита в эксперименте // Вопросы вирусологии. — 2003. — № 2. — С. 22–25.
8. Игнатъев Г.М., Отрашевская Е.В., Воробьева М.С. Продукция некоторых цитокинов при экспериментальной инфекции вирусом клещевого энцефалита у мышей // Вопросы вирусологии. — 2003. — № 1. — С. 18–21.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — С. 113–124.
10. Мезенцева М.В., Морозова О.В., Гришечкин А.Е., Подчерняева Р.Я., Воробьева М.С., Злобин В.И. Экспрессия генов цитокинов при инфекции, вызванной вирусом клещевого энцефалита в культуре клеток человека // Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями: материалы междунар. конф. — СПб., 2010. — С. 31–32.
11. Морозова О.В., Бахвалова В.Н., Панов В.В. Сравнение методов детекции вируса клещевого энцефалита // Фундаментальные науки — медицине. — Издательство «Арта», 2008. — С. 171–177.
12. Морозова О.В., Бахвалова В.Н., Чичерина Г.С., Потапова О. Ф., Исаева Е.И. Сравнение экспрессии генов цитокинов у мышей, иммунизированных или зараженных вирусом клещевого энцефалита // Интерферон-2011: сб. науч. статей. — 2012. — С. 461–465.

13. Морозова О.В., Гришечкин А.Е., Бахвалова В.Н., Исаева Е.И., Подчерняева Р.Я. Динамика репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток // Вопросы вирусологии. — 2012. — № 2. — С. 40–43.
14. Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. Хронический клещевой энцефалит. — Новосибирск: Наука, 1986. — 232 с.
15. Попонникова Т.В., Бедарева Т.Ю., Вахрамеева Т.Н., Галиева Г.Ю. Цитокиновый профиль в остром периоде клещевых нейроинфекций у детей // Журнал неврологии и психиатрии. — 2010. — № 5. — С. 9–12.
16. Удинцева И.Н., Чечина О.Е., Жукова Н.Г., Лукашова Л.В., Рязанцева Н.В., Попонина А.М., Малышева Л.А., Бартфельд Н.Н., Першина С.А. Клинико-иммунологические аспекты клещевого энцефалита // Бюл. сибирской медицины. — 2008. — № 5. — С. 182–189.
17. Чечина О.Е., Рязанцева Н.В., Сазонова Е.В., Жукова Н.Г., Удинцева И.Н., Новицкий В.В. Механизмы апоптоза лимфоцитов при клещевом энцефалите // Бюл. сибирской медицины. — 2011. — № 6. — С. 61–65.

Ссылки 18–26 см. в References (с. 42). See References for numbers 18–26 at p. 42.

Infekciã i immunitet (Infection and Immunity)
2014, vol. 4, no. 1, pp. 37–42

ORIGINAL ARTICLES

THE CYTOKINES SYNTHESIS *IN VITRO* IN THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS INFECTED CELLS AND IN THE PRESENCE OF INACTIVATED VACCINE

Mesentseva M.V., Antoshina I.F., Morozova O.V.

Ivanovsky Institute of Virology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Tick-borne encephalitis (TBE) is severe neuroinfectious disease with involvement of immune mechanisms in pathogenesis. Comparative analysis of synthesis of key cytokines had been performed for the TBE virus (TBEV) infected cells and in the presence of inactivated vaccine against TBE *in vitro*. Persistent TBEV infection of immortal tissue culture of human larynx cancer cells caused transcription activation of interferons IFN α , IFN γ , IFN λ 1, interleukins IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, tumour necrosis factor TNF α as well as one of apoptosis factors Fas. Comparison of transcription and production of cytokines revealed that the TBEV infection resulted in posttranscription Th1 shift of cytokine response. In the presence of inactivated vaccine against TBE based on the same strain Sofjin of the TBEV activation of transcription of cytokines IFN α , IFN λ 1, IL-4, IL-10 was also observed as after the TBEV infection that together with an additional stimulation of GM-CSF production might serve as an evidence of Th2 response. Involvement of IFNIII type (IFN λ 1) both during persistent infection and after addition of inactivated vaccines was found in the first time. Differences in dynamics of cytokines IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α response during the TBEV infection and in the presence of inactivated vaccine are described.

Key words: tick-borne encephalitis virus, inactivated vaccine against tick-borne encephalitis, cytokines.

Authors:

Mesentseva M.V. ✉, PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Cell Cultures, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Moscow, Russian Federation.

123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 16, D.I. Ivanovsky Institute of Virology.

Phone/fax: (499) 190-28-50 (office); +7 916 126-24-20 (mobile). E-mail: marmez@mail.ru;

Antoshina I.F., Applicant, Laboratory of Cell Cultures, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Moscow, Russian Federation;

Morozova O.V., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Immunology, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Moscow, Russian Federation.

References

1. Avdeeva Zh.I., Akol'zina S.E., Alpatova N.A., Nikitina T.N., Rashchepkina M.N., Medunitsyn N.V. Vliyanie tsitokinov na immunogennyye svoystva vaksiny protiv kleshchevogo entsefalita [The influence of cytokines on the immunogenic properties of the vaccine against the tick-borne encephalitis]. *Tsitokiny i vospalenie — Tsitokiny i vospaleniye*, 2009, no. 2, pp. 16–21.
2. Bondarenko A.L., Tikhomolova E.G., Zyкова I.V., Kontyakova E.L., Zyanchurina G.M. Prognosticheskoe znachenie immunoregulyatornykh Th1- i Th2-tsitokinov pri kleshchevom entsefalite [Prognostic significance of immunoregulatory Th1- and Th2 cytokines during the tick-borne encephalitis]. *Infektsionnyye bolezni — Infectious Diseases*, 2011, no. 1, pp. 28–32.
3. Grigoryan S.S. Interferony Iyambda (3-y tip interferonov) i virusnyye infektsii [Interferons lambda (the third type of interferons) and viral infections]. *Interferon-2011: sbornik nauchnykh statey* [Interferon-2011: collection of articles]. 2012, pp. 63–72.
4. Ershov F.I. Antivirusnyye preparaty [Spravochnik] (Antiviral drugs. Directory). *Moscow, Medicine Publ.*, 1998, 187 p.
5. Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N., Mezentseva M.V. Rannie tsitokinovyye reaktsii pri virusnykh infektsiyakh [Early cytokine responses to viral infections]. *Tsitokiny i vospalenie — Tsitokiny i vospaleniye*. 2004, vol. 3, no. 1, pp. 3–6.
6. Zima A.P. Sistema tsitokinov i ikh retseptorov pri khronicheskikh virusnykh infektsiyakh: avtoref. dis. dokt. med. nauk. [The system of cytokines and their receptors in chronic viral infections. Autoref. dr. med. sci. diss.]. *Tomsk*, 2008, 44 p.

7. Ignat'ev G.M., Vorob'eva M.S., Otrashesvskaya E.V. Aktivnost' tsitokinov pri immunizatsii vaksinoi protiv kleshchevogo entsefalita v eksperimente [Activity of cytokines after immunization with the vaccine against the tick-borne encephalitis in experiment]. *Voprosy virusologii — Problems of Virology*, 2003, no. 2, pp. 22–25.
8. Ignat'ev G.M., Otrashesvskaya E.V., Vorob'eva M.S. Produktiya nekotorykh tsitokinov pri eksperimental'noy infektsii virusom kleshchevogo entsefalita u myshey [Production of certain cytokines in experimental infection of mice with the tick-borne encephalitis virus]. *Voprosy virusologii — Problems of Virology*, 2003, no. 1, pp. 18–21.
9. Lakin G.F. Biometriya [Biometrics]. Moscow: High School, 1990, pp. 113–124.
10. Mezentseva M.V., Morozova O.V., Grishechkin A.E., Podchernyaeva R.Ya., Vorob'eva M.S., Zlobin V.I. Ekspressiya genov tsitokinov pri infektsii, vyzvannoy virusom kleshchevogo entsefalita v kul'ture kletok cheloveka [Gene expression of cytokines in infection caused by the tick-borne encephalitis virus in cultured human cells]. *Razvitiye nauchnykh issledovaniy i nadzor za infektsionnymi zabolevaniyami: materialy mezhdunarodnoy konferentsii [Proceedings of the international conference "Development of scientific research and surveillance of infectious diseases"]*. St. Petersburg, 2010, pp. 31–32.
11. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Panov V.V. Sravnenie metodov detektsii virusa kleshchevogo entsefalita [Comparison of the tick-borne encephalitis virus detection methods]. *Fundamental'nye nauki — meditsine — Basic sciences to medicine*, Novosibirsk: Arta Publ., 2008, pp. 171–177.
12. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Chicherina G.S., Potapova O. F., Isaeva E.I. Sravnenie ekspressii genov tsitokinov u myshey, immunizirovannykh ili zarazhennykh virusom kleshchevogo entsefalita [Comparison of gene expression of cytokines in mice immunized or infected with the tick-borne encephalitis virus]. *Interferon-2011: sbornik nauchnykh statey [Interferon-2011: collection of articles]*. 2012, pp. 461–465.
13. Morozova O.V., Grishechkin A.E., Bakhvalova V.N., Isaeva E.I., Podchernyaeva R.Ya. Dinamika reproduksii virusa kleshchevogo entsefalita v kul'turakh kletok [Dynamics of the tick-borne encephalitis virus reproduction in cell cultures]. *Voprosy virusologii — Problems of Virology*, 2012, no. 2, pp. 40–43.
14. Pogodina V.V., Frolova M.P., Erman B.A. Hronicheskiy kleshchevoy entsefalit [Chronic tick-borne encephalitis]. *Novosibirsk: Science Publ.*, 1986, 232 p.
15. Poponnikova T.V., Bedareva T.Yu., Vakhrameeva T.N., Galieva G.Yu. Tsitokinovyy profil' v ostrom periode kleshchevykh neyroinfektsiy u detey [The cytokine profile in the acute period of tick neuroinfections in children]. *Zhurnal neurologii i psikiatrii — Journal of Neurology and Psychiatry*. 2010, no. 5, pp. 9–12.
16. Udintseva I.N., Chechina O.E., Zhukova N.G., Lukashova L.V., Ryazantseva N.V., Poponina A.M. Malysheva L.A., Bartfel'd N.N., Pershina S.A. Kliniko-immunologicheskie aspekty kleshchevogo entsefalita [Clinical and immunological aspects of the tick-borne encephalitis]. *Byulleten' sibirskoy meditsiny — Bulletin of Siberian Medicine*, 2008, no. 5, pp. 182–189.
17. Chechina O.E., Ryazantseva N.V., Sazonova E.V., Zhukova N.G., Udintseva I.N., Novitskiy V.V. Mekhanizmy apoptoza limfotsitov pri kleshchevom entsefalite [The mechanisms of lymphocyte apoptosis in the tick-borne encephalitis]. *Byulleten' sibirskoy meditsiny — Bulletin of Siberian Medicine*, 2011, no. 6, pp. 61–65.
18. Antoshina I.F., Mezentseva M.V., Shapoval I.M., Morozova O.V., Zlobin V.I. Flavivirus Encephalitis and Immune Response. *Int. J. Biomedicine*, 2011, vol. 1, no. 4, pp. 231–235.
19. Biswas S.M., Ayachit V.M., Sapkal G.N., Mahamuni S.A., Gore M.M. Japanese encephalitis virus produces a CD4⁺ Th2 response and associated immunoprotection in an adoptive-transfer murine model. *J. Gen. Virol.*, 2009, no. 90, pp. 818–826.
20. Biswas S.M., Kar S., Singh R., Chakraborty D., Vipat V., Raut C.G., Mishra A.C., Gore M.M., Ghosh D. Immunomodulatory cytokines determine the outcome of Japanese encephalitis virus infection in mice. *J. Med. Virol.*, 2010, vol. 82, no. 2, pp. 304–310.
21. Das S., Mishra M.K., Ghosh J., Basu A. Japanese Encephalitis Virus infection induces IL-18 and IL-1beta in microglia and astrocytes: correlation with in vitro cytokine responsiveness of glial cells and subsequent neuronal death. *J. Neuroimmunol.*, 2008, vol. 195, no. 1–2, pp. 60–72.
22. Hedrick S.M., Ch'en I.L., Alves B.N. Intertwined pathways of programmed cell death in immunity. *Immunol. Rev.*, 2010, no. 236, pp. 41–53.
23. Hernandez J.B., Newton R.H., Walsh C.M. Life and death in the thymus-cell death signaling during T cell development. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010, no. 22, pp. 865–871.
24. Thongtan T., Thepparit C., Smith D.R. The involvement of microglial cells in Japanese encephalitis infections. *J. Immunol. Res.*, 2012, vol. 2012, article ID 890586, 7 p. Available on <http://dx.doi.org/10.1155/2012/890586>.
25. Zhang J.S., Zhao Q.M., Zuo S.Q., Jia N., Guo X.F. Cytokine and chemokine responses to Japanese encephalitis live attenuated vaccine in a human population. *Int. J. Infect. Dis.*, 2012, vol. 16, no. 4, pp. 285–288.
26. Zhdanov V.M., Gavrillov V.I., Bogomolova N.N., Klimenko S.M., Andzhaparidze O.G. Biochemical study of HEp-2 cells chronically infected with the tick-borne encephalitis virus. *Rev. Roum. Virol.*, 1974, vol. 25, no. 1, pp. 75–89.

Received 10.02.2014

Revision received 12.02.2014

Accepted 21.02.2014