

55 0Д
27 ОКТ 1998

На правах рукописи

Фирстова Виктория Валерьевна

**ВЛИЯНИЕ ЧУМНОГО МИКРОБА И ЕГО АНТИГЕНОВ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИ ГЕТЕРОГЕННЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ
ФАГОЦИТОВ**

03.00.07 - микробиология

14.00.36 - аллергология и иммунология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов - 1998

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» МЗ РФ

Научные руководители:
 доктор медицинских наук, профессор Ледванов М.Ю.,
 кандидат медицинских наук, с.н.с. Стукова Н.Ю.

Министерство здравоохранения Российской Федерации
 Федеральное государственное учреждение «Российский противочумный институт»

Официальные оппоненты:
 Заслуженный деятель науки Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор Л.В.Самойлова,
 кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Г.М.Сергеева

Общественные оппоненты:
 доктор медицинских наук, профессор Н.Д.Славина
 кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Г.М.Сергеева

Ведущая организация:
 Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Волгоградский противочумный институт

Защита состоится «26» сентября 1998 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 074.32.01 Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» по адресу 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке института «Микроб».

Автореферат разослан «26» сентября 1998 г.

Автореферат разослан

Ученый секретарь диссертационного совета
 доктор биологических наук, профессор

Ученый секретарь
 Г.А.Корнев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Совершенствование специфической профилактики чумы является одной из актуальных задач иммунологии. Решение этой проблемы требует комплексного подхода, который включает в себя исследование механизмов формирования противочумного иммунитета. Фундаментальными исследованиями ряда ученых (Нустовалов В.Л. с соавт., 1984; Васильева Г.И. с соавт., 1990-1998; Ледванов М.Ю. с соавт., 1990-1997; Наумов А.В. с соавт., 1992) было доказано, что течение вакцинного и инфекционного процессов при чуме в значительной степени зависит от исхода взаимодействия клеток макрофагального звена с возбудителем инфекции.

К настоящему времени изучено влияние чумного микроба и его антигенов на ряд функциональных, метаболических и морфологических изменений клеток системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ). Современные представления о роли клеток СМФ основываются на их гетерогенности по функциональной активности, экспрессии поверхностных структур, регуляторным и эффекторным свойствам. Мононуклеарные фагоциты выполняют множество функций в большинстве из которых участвует клеточная поверхность и большое количество мембран-связанных плазматических молекул клеток (рецепторы к Fc-части иммуноглобулина, к компонентам комплемента, к терминалу сахарных остатков и т.д.). Необычайная сложность проблемы гетерогенности фагоцитарных клеток требует разработки новых нетрадиционных подходов к ее анализу. Одним из методов тестирования функционального состояния клеток СМФ является определение их электрофоретической подвижности (ЭФП), обусловленной величиной электрического заряда клеток. Электрический заряд, структура поверхностной мембраны и функциональные свойства клетки находятся в тесной взаимосвязи. Метод проточного распределительного клеточного электрофореза в свободном потоке дает возможность изучить характер изменений ЭФП клеток под действием на организм или непосредственно на мононуклеарные фагоциты различных антигенов и вакцин. В работах ряда исследователей (Ермакова Г.В., 1982; Корсуков В.Н., 1984; Ледванов М.Ю., 1984; Тихомирова Л.А., 1985; Тихомирова Е.И., 1990) показана возможность использования данного метода в качестве важного иммунологического критерия, характеризующего изменения ЭФП лимфоцитов в процессе иммуногенеза к чуме. Тем не менее, нами не было найдено работ, касающихся динамики изменений ЭФП фагоцитирующих клеток при формировании иммунитета к чуме. Неизвестна популяционная и функциональная гетерогенность фагоцитов, различающихся по признаку электрофоретической подвижности. Известно, что популяции клеток СМФ различаются по экспрессии ключевых ферментов окислительного и гликолитического пути метаболизма (Хайтов Р.М., 1995). Однако сравнительной оценки биохимических показателей электрокинетически гетерогенных популяций фагоцитов при взаимодействии с различными штаммами чумного микроба до настоящего времени не проводилось.

Цель работы: изучить влияние чумного микроба и его антигенов на функционально-метаболическую активность электрокинетически гетерогенных популяций фаго-

цитирующих клеток, определить возможность использования показателей электрофоретической подвижности фагоцитов для оценки иммунобиологических свойств чумного микроба и его антигенов, а также иммуномониторинга противочумного вакцинного процесса.

Задачи исследования

1. Изучить влияние иммунизации мышей (беспородных и инбредных) вакцинным штаммом *Y.pestis EV* на изменение электрофоретической подвижности перитонеальных макрофагов.
2. Определить характер и количественные критерии изменения электрофоретической подвижности перитонеальных макрофагов при взаимодействии *in vitro* с клетками *Y.pestis EV*.
3. Изучить влияние иммунизации мышей и морских свинок основным соматическим и капсульным антигенами *Y.pestis* на изменение электрофоретической подвижности перитонеальных макрофагов.
4. Установить изменения электрофоретической подвижности моноцитов крови людей при взаимодействии *in vitro* с основным соматическим и капсульным антигенами *Y.pestis*.
5. Провести сравнительный анализ изменений ключевых ферментов пентозофосфатного пути обмена углеводов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы), цикла Кребса (сукцинатдегидрогеназы) и гликолиза (лактатдегидрогеназы) в электрокинетически гетерогенных фракциях фагоцитов в динамике взаимодействия с основным соматическим и капсульным антигенами *Y.pestis*.
6. Изучить функциональную активность электрокинетически гетерогенных популяций макрофагов при взаимодействии *in vitro* с клетками *Y.pestis EV*.
7. Определить возможность использования показателей электрофоретической подвижности фагоцитов для оценки иммунобиологических свойств чумного микроба и его антигенов, а также для иммуномониторинга противочумного вакцинного процесса.

Научная новизна. Впервые с использованием свободного распределительного клеточного электрофореза в потоке показано, что иммунизация белых мышей вакцинным штаммом *Y.pestis EV* сопровождается снижением электрофоретической подвижности основного пула перитонеальных макрофагов и появлением электрофоретически гетерогенных популяций. Обнаружено, что изменения электрокинетических свойств макрофагов в процессе иммуногенеза к чуме зависят от генотипа животных. Инбредная линия мышей CC57W реагирует меньшим, по сравнению с беспородными, снижением электрофоретической подвижности (ЭФП) макрофагов. Выявлены характерные для линии CC57W особенности формирования электрофоретически гетерогенных популяций перитонеальных макрофагов.

Впервые установлено, что иммунизация белых мышей основным соматическим и капсульным антигенами чумного микроба вызывает снижение ЭФП основной массы макрофагов, формирующих в большинстве сроков исследования две электрофоретически различающиеся популяции. Капсульный антиген обладает более выраженной, по сравнению с основным соматическим, способностью снижать ЭФП фагоцитов. Макрофаги не-

иммунизированных морских свинок формируют пять электрофоретически гетерогенных популяций. Иммунизация морских свинок капсульным антигеном сопровождается резким снижением ЭФП макрофагов и преобладанием трех электрофоретически различающихся популяций клеток.

Новыми являются данные, показавшие, что адгезия макрофагов к стеклу, сопровождающаяся активацией клеток, приводит к фазному изменению ЭФП популяций фагоцитов - снижению ЭФП, сменяющемуся повышением их электрокинетического потенциала. Взаимодействие *in vitro* макрофагов животных и моноцитов крови людей с клетками и антигенами *Y. pestis* EU сопровождается характерными изменениями конфигурации кривой распределения макрофагов по электрофоретической подвижности.

Впервые исследован в электрокинетически гетерогенных популяциях фагоцитов характер изменений активности ключевых ферментов углеводного обмена. Показано, что взаимодействие *in vitro* антигенов чумного микроба с моноцитами крови людей сопровождается снижением их электрофоретической подвижности и увеличением внутриклеточной активности ключевых ферментов пентозофосфатного пути обмена углеводов - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и гикольического пути - лактатдегидрогеназы. Под влиянием капсульного антигена активность сукцинатдегидрогеназы снижается. Внутри общего пула выделенных моноцитов максимальные ферментативные активности регистрируются в субпопуляциях, характеризующихся более высокой электрофоретической подвижностью.

Комплексный анализ функциональной (фагоцитарного индекса и фагоцитарной активности) и метаболической активности различных типов фагоцитов позволил выявить наличие стереотипной реакции мембран в процессе активации клеток, выражающейся в снижении их электрокинетического потенциала.

На модели взаимодействия (*in vivo* и *in vitro*) фагоцитирующих клеток с чумным микробом и его антигенами подтверждена необходимость пересмотра представлений и подходов к оценке роли этих клеток в иммунопатогенезе чумы с учетом их популяционной гетерогенности.

Практическая значимость работы. Определены количественные критерии изменений электрофоретической подвижности макрофагов, нейтрофильных лейкоцитов и моноцитов при контакте *in vivo* и *in vitro* с чумным микробом и его антигенами. Расширены границы области практического применения проточного клеточного распределительного электрофореза для изучения функциональной активности отдельных популяций фагоцитирующих клеток. Показана эффективность использования тестирования электрофоретической подвижности фагоцитов для характеристики иммунобиологических свойств антигенов чумного микроба и иммуномониторинга противочумного вакцинационного процесса. Метод определения электрофоретической подвижности фагоцитирующих клеток (тестирование формирования электрокинетически гетерогенных популяций фагоцитов) рекомендуется для использования на этапах испытания новых или усовершенствованных противочумных вакцинных препаратов, а также при составлении рациональных

схем иммунизации и при экспериментальной разработке патогенетически обоснованных способов иммунокоррекции.

Внедрение. По материалам экспериментальных исследований составлены методические рекомендации: "Оценка популяционного состава клеток системы мононуклеарных фагоцитов методом разделительного клеточного электрофореза", которые были обсуждены и одобрены Ученым Советом РНИПЧИ "Микроб" (протокол №15 от 19 ноября, 1996г), утверждены директором 19 ноября, 1996г. Метод применяется в научных исследованиях на кафедре гистологии (СГМУ), НИИ кардиологии при СМУ, 5-ой детской объединенной инфекционной больницы г.Саратова, о чем имеются соответствующие акты о внедрении. Материалы диссертационного исследования используются при чтении лекций на курсах специализации врачей по особо опасным инфекциям и курсах усовершенствования врачей-бактериологов санитарно-эпидемиологических учреждений России (при институте "Микроб").

Апробация работы. Материалы диссертации представлены:

-на межгосударственной научной конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы, Алматы, 1994;

-на научной конференции, посвященной 60-летию Иркутского ПЧИ, Иркутск, 1994;

-на итоговой научной конференции в РНИПЧИ "Микроб", Саратов, 1994;

-на международной конференции по иммунореабилитации, Дагомыс, 1994;

-на международной конференции "Гомеостаз и инфекционный процесс", Саратов, 1996;

-на научной конференции "Эколого-эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекциями в Северном Прикаспии", Астрахань, 1996;

-на научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России, Саратов, 1997;

-на съезде акушеров-гинекологов, Самара, 1997;

-на Российской научной конференции "Человек и здоровье", С.-Петербург, 1997.

Диссертация обсуждена и одобрена на расширенной научной конференции лаборатории иммунологии РосНИПЧИ "Микроб", 1998г. .

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста и содержит: введение, пять глав, заключение, выводы и библиографический указатель, который включает 162 отечественных и 95 иностранных источников. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 4 таблицами.

Основные положения, выносимые на защиту.

1.Характеристика основных закономерностей влияния *in vivo* и *in vitro* чумного микроба на функционально-метаболическую активность электрокинетически гетерогенных субпопуляций фагоцитирующих клеток.

2.Зависимость изменения электрокинетических свойств макрофагов в процессе иммуногенеза к чуме от генотипа животных.

3. Новые данные сравнительного анализа электрокинетических свойств макрофагов, моноцитов, нейтрофильных лейкоцитов при взаимодействии с основным соматическим и капсульным антигенами чумного микроба.

4. Новые данные сравнительного анализа изменений активности ферментов угледного обмена (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа) в электрокинетически гетерогенных субпопуляциях фагоцитов в динамике иммуногенеза к чуме.

5. Установление обратной коррелятивной зависимости между функционально-таблической активностью фагоцитов и их электрофоретической подвижностью.

6. Доказательства эффективности использования свободного распределительного точного электрофореза для оценки популяционной гетерогенности и функциональной активности клеток системы мононуклеарных фагоцитов в динамике иммуногенеза к чуме.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы

Работа выполнена на лабораторных животных: морских свинках, нелинейных мышах, на белых мышах линии СС57W, В10СW 3-4-месячного возраста. Материалом для исследований служили индуцированные перитонеальные макрофаги экспериментальных животных, а также клетки мононуклеарно-фагоцитарной крови, выделенные из крови здоровых людей.

Для иммунизации использовали следующие препараты чумного микроба: чинный штамм ЕВ НИИЭГ и его антигены - основной соматический антиген (СА) чумного микроба, полученный из ацетонвысушенных клеток экстракцией хлоруксусной кислотой (Boivin A. et al., 1933); капсульный антиген (F1), выделенный по методу Baker E. et al. (1952) из солевого экстракта ацетонвысушенных ток возбуждителя чумы в процессе фракционирования сульфатом аммония.

Экспериментальным животным подкожно вводились антигены (20 мкг на мыш) или клетки вакцинного штамма ЕВ НИИЭГ (в дозе 5×10^5 м.кл. на мыш). Следующие показатели фагоцитирующих мононуклеаров определяли в динамике чинного процесса (in vivo). Часть экспериментов проводили в кратковременной культуре мононуклеарных фагоцитов (МФ) при непосредственном взаимодействии фагоцитов с клетками вакцинного штамма ЕВ НИИЭГ или его антигенами (in vitro).

Индукцированные перитонеальные макрофаги белых мышей и морских свинок получали по методу Учитель И.Я. (1978).

Моноциты и нейтрофильные лейкоциты крови человека выделяли в соответствии с рекомендациями Хейфец Л.Б. (1973).

Определение электрофоретической подвижности (ЭФП) фагоцитирующих моноцитов осуществляли на аппарате Elphor VaP-5. Разделение клеток проводили на напряжении 500V и силе тока 120mA. Скорость тока буфера в камере составила 300 мл/ч, скорость подачи клеток в камеру - 3 мл/ч, в камере разделения

поддерживалась температура $+6^{\circ}\text{C}$. Количество клеток в полученных фракциях подсчитывали в камере Горяева, а затем высчитывали процентное содержание фагоцитирующих лейкоцитов во всех фракциях по отношению к общему числу клеток, полученных после разделения. На основе полученных данных строили электрофоретическую кривую, где по оси абсцисс отмечали число фагоцитов (в процентах), а по оси ординат - номера фракций.

Жизнеспособность клеток до и после электрофоретического разделения определяли при помощи теста с трепановым синим (1% раствор).

Для определения взаимосвязи между изменениями показателей ЭФП фагоцитирующих лейкоцитов и их функциональной активностью определяли фагоцитарные и биохимические показатели фагоцитов в отдельных фракциях, полученных после сепарации клеточной взвеси на аппарате Elphog VaP-5.

Постановка фагоцитарных реакций. В монослой кратковременной культуры фагоцитов добавляли взвесь 2-суточной агаровой культуры штамма *Y.pestis EV* НИИЭГ в концентрации $1 \cdot 10^6$ КОЕ (микробная нагрузка составляла 50 микробных клеток), 3 мл среды 199 и инкубировали в течение 10, 30, 60, 90 минут при 37°C в водонасыщенной атмосфере, содержащей 5% углекислого газа. Параллельно ставили контроль (клетки инкубировались без добавления штамма чумного микроба). По истечении срока культивирования фагоцитирующие лейкоциты сепарировали на аппарате Elphog VaP-5. Клетки подсчитывали в камере Горяева из каждой фракции, готовили мазки и окрашивали по Романовскому-Гимза. Препараты просматривали в световом микроскопе при увеличении $\times 1350$.

Интенсивность фагоцитоза определяли, подсчитывая следующие показатели:

- 1) фагоцитарный индекс - среднее количество микробов, поглощенное одним фагоцитирующим лейкоцитом;
- 2) фагоцитарную активность - число активных фагоцитов из 100 сосчитанных.

Определение ферментативной активности клеток СМФ

Активность сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли в отдельных фракциях моноцитов крови человека, полученных после сепарации на аппарате Elphog VaP-5. Клетки разрушались трехкратным замораживанием и оттаиванием, центрифугированием при 3 тыс.об./мин. Активность ферментов определяли в супернатанте с использованием специальных наборов реактивов фирмы «Boehringer Mannheim».

Принцип метода определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы основан на восстановлении НАДФ при окислении глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. По мере образования НАДФН абсорбция при 340nm возрастает. Активность фермента рассчитывалась по таблице и выражалась в $\text{U}/10^6$ моноцитов.

Определение активности малатдегидрогеназы основано на превращении под действием глутаматоксалоацетат трансминазы L-аспартата и α -оксoglукотрата в L-глутамат и оксалоацетат, последний в присутствии восстановленной формы НАД под действием

малатдегидрогеназы, содержащейся в исследуемом образце, превращается в L-малат. По убыли НАДН, регистрируемой по уменьшению оптической плотности при 340нм, рассчитывалась активность малатдегидрогеназы, выражавшаяся в $U/10^6$ моноцитов.

Определение активности лактатдегидрогеназы основано на превращении пирувата в присутствии НАДН под действием лактатдегидрогеназы в L-лактат. Активность фермента рассчитывалась по понижению поглощения НАДН при 340нм, выражалась в $U/10^6$ моноцитов.

Принцип метода определения активности сукцинатдегидрогеназы основан на превращении фруктозы в сорбитол под действием сукцинатдегидрогеназы. Активность фермента рассчитывалась по понижению поглощения НАДН при 340нм, выражалась в $U/10^6$ моноцитов.

Статистический анализ. Все результаты, полученные при проведении исследований, обработаны статистически общепринятыми методами. Вычисляли среднюю арифметическую (M), коэффициент достоверности (t), корреляционную зависимость (R).

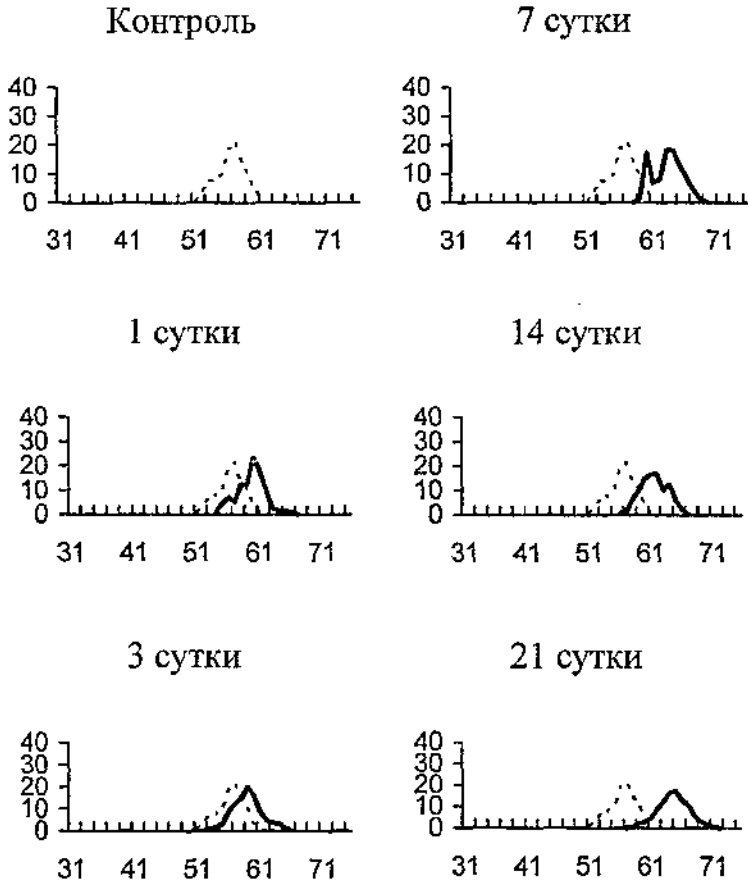
Расчеты, проведенные в ходе выполнения работы, проводили с применением специальных компьютерных программ.

2. Результаты исследований и их обсуждение.

В результате выполненных исследований получены следующие основные результаты.

Иммунизация мышей вакцинным штаммом *Y.pestis EV* во все сроки наблюдения приводила к снижению электрофоретической подвижности перитонеальных макрофагов по сравнению с контролем (рис1.). В качестве контроля служили неиммунизированные животные. Уже на 1 сутки иммуногенеза было обнаружено разделение общего пула макрофагов на две субпопуляции. Большая по количеству клеток субпопуляция макрофагов обладала более низкой электрофоретической подвижностью. Наиболее значимое разделение перитонеальных макрофагов на субпопуляции с различной электрофоретической подвижностью было зарегистрировано на 7 и 14 сутки иммуногенеза. На 21 сутки формирования иммунитета к чуме вся популяция перитонеальных макрофагов была представлена одним пулом клеток со значительно сниженной электрофоретической подвижностью по сравнению с контролем.

Обнаруженное нами снижение электрофоретической подвижности макрофагов, вероятно, связано с изменением мозаики поверхностных антигенов. Возможно количество детерминант, несущих отрицательный заряд уменьшается в результате интернализации мембраны, либо в результате маскировки их вновь образующимися или присоединенными молекулами (иммуноглобулинами, цитокинами и т.д.). Полученные нами данные согласуются с результатами исследований Клусzynski A., 1978; Malkosky M., 1980; Bauer J., 1992, показавших, что снижение отрицательного электрокинетического потенциала клеток системы фагоцитирующих мононуклеаров связано с их активацией. На разных этапах иммуногенеза к чуме в процесс иммунобиологической перестройки, оче-

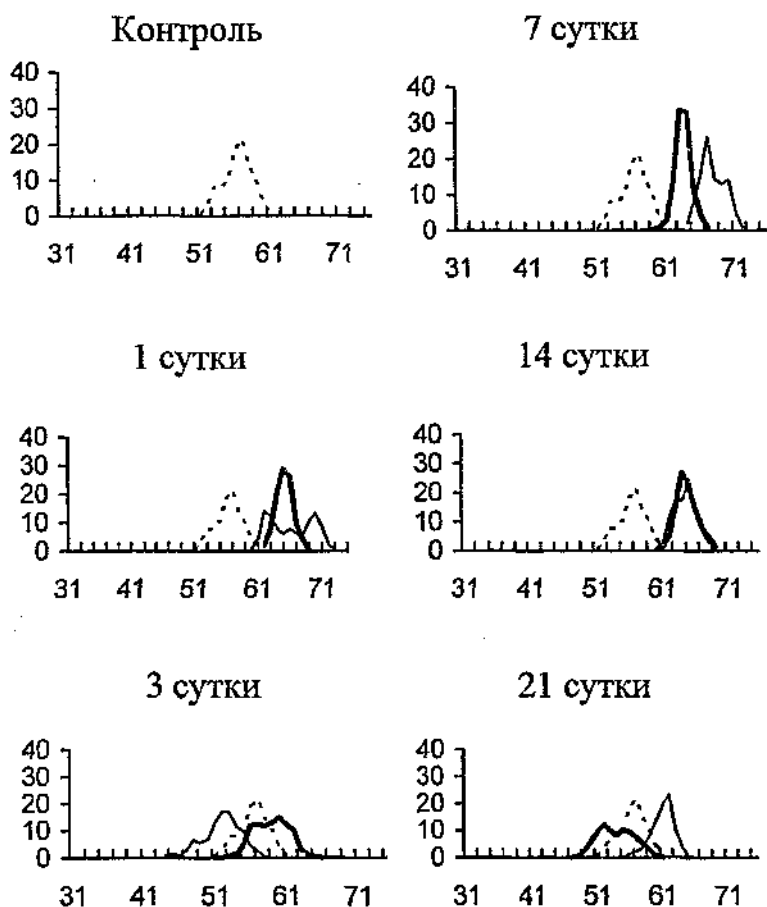


Пунктирная линия - клетки, полученные от неиммунизированных животных; сплошная линия - клетки, полученные от иммунизированных животных в различные сроки иммуногенеза. По оси абсцисс - номера фракций; по оси ординат - содержание клеток (%).

Рис.1. Изменение электрофоретической подвижности индуцированных перитонеальных макрофагов белых мышей в различные сроки после иммунизации *Y.pestis EV*.

видию, вовлекаются различные субпопуляции клеток системы фагоцитирующих мононуклеаров. Обращает внимание, что к 21 дню (сроку развития максимально выраженного протективного иммунитета) наибольший процент клеток системы мононуклеарных фагоцитов у мышей обладав сниженной электрофоретической подвижностью. Последнее, по видимому, свидетельствует о значительной степени генерализации процесса иммунологической перестройки под влиянием живой чумной вакцины (штамма EV).

При анализе взаимосвязи изменений электрофоретической подвижности у беспородных мышей и мышей линии CC57W было отмечено, что линейные мыши реагировали меньшим снижением электрофоретической подвижности макрофагов в ответ на иммунизацию живой чумной вакциной. Контрольная электрофореграмма мышей линии CC57W была представлена одним пиком выхода клеток, соответствующем 47 и 48 фракциям, которые содержали 44.39 % макрофагов от общего количества. В процессе иммуногенеза наблюдали смещение профилей электрофореграмм, но не более чем на 5 фракций. Электрофореграммы нелинейных мышей при формировании иммунитета к чуме смещались на 8-10 фракций относительно контроля. К 21 суткам и иммуногенеза наблюдалось повышение ЭФП макрофагов до исходного уровня. Однако данный профиль распределения клеток отличался от контрольного. 58.17 % клеток равномерно распределялись с 45 по 49 фракции, в то время как в контроле 61.31 % макрофагов выходили в трех каналах (46, 47, 48 фракции). Следует отметить, что линия CC57W является более чувствительной к чумной инфекции и интоксикации, чем беспородные мыши. В результате иммунизации живой чумной вакциной у CC57W-мышей формируется менее выраженный протективный иммунитет, чем у беспородных. Не исключено, что последнее может быть связано с недостаточной активацией клеток системы мононуклеарных фагоцитов. Это предположение согласуется с полученными результатами - отсутствие на 21 сутки значительного пула активированных макрофагов, макрофагов с пониженной электрофоретической подвижностью. Электрофоретическое тестирование клеток системы мононуклеарных фагоцитов с определенной степенью достоверности позволяет судить о генетически детерминированном формировании субпопуляционной гетерогенности и доле активированных макрофагов на отдельных этапах иммуногенеза к чуме. Для понимания механизмов развития иммунологической перестройки в зараженном или вакцинированном организме необходимо иметь четкие представления об особенностях влияния на макрофаги отдельных компонентов возбудителя. Среди антигенов *Y.pestis EV* особое значение представляют такие антигены как капсульный и основной соматический. Интерес к их изучению обусловлен не только многообразием их иммунологических функций, но и возможностью эффективного применения в составе химической чумной вакцины. Результаты проведенных исследований показали, что иммунизация животных основным соматическим антигеном чумного микроба приводит к снижению ЭФП основной массы макрофагов, по сравнению с контролем (рис.2). К 21 суткам иммуногенеза наблюдалось восстановление электрокинетического заряда клеток и даже увеличение его у отдельных субпопуляций макрофагов. Капсульный антиген вызывал более выраженное влияние на клетки



Пунктирная линия - клетки, полученные от неиммунизированных животных; сплошная линия - клетки, полученные от иммунизированных животных капсульным антигеном; жирная линия - основным соматическим антигеном в различные сроки иммуногенеза. По оси абсцисс - номера фракций; по оси ординат - содержание клеток (%)

Рис.2. Изменение электрофоретической подвижности индуцированных перитонеальных макрофагов белых мышей в различные сроки после иммунизации капсульным или основным соматическим антигеном чумного микроба.

системы фагоцитирующих мононуклеаров. Это проявлялось как в более значительном снижении ЭФП исследуемых клеток, так и степени их гетерогенности. Полученные нами данные согласуются с предположением Г.И.Васильевой с соавт. (1994) о существовании строгой прямой корреляции между протективными свойствами препаратов, используемых для иммунизации против чумы и характером распределения субпопуляций макрофагов.

Наряду с белыми мышами наиболее распространенной экспериментальной моделью изучения противочумного иммунитета является морская свинка. По мнению ряда исследователей процессы иммунобиологической перестройки организма морских свинок при взаимодействии с антигенами чумного микроба наиболее близки к регистрируемому у человека. В связи с этим в сравнительном аспекте исследование влияния капсульного антигена на электрокинетические свойства макрофагов было проведено также на морских свинках.

Проведенные нами исследования позволили установить резкое снижение ЭФП перитонеальных макрофагов морских свинок во все сроки иммуногенеза. Максимальное снижение ЭФП МФ наблюдали на 7 сутки. К 21 суткам иммуногенеза регистрировалось некоторое восстановление ЭФП клеток. Важно отметить, что МФ неиммунизированных морских свинок характеризовались большей гетерогенностью по электро-кинетическим характеристикам, чем клетки иммунизированных животных. Во все сроки после иммунизации морских свинок наблюдали появление на электрофореграммах трех пиков максимального процента выхода клеток, в то время как для электрофореграммы контроля было характерно наличие пяти пиков.

Обнаруженные нами изменения электрофоретической подвижности макрофагов при иммунизации мышей живой чумной вакциной могли быть связаны не только с влиянием чумного микроба или различных цитокинов, действующих *in situ*, но и явиться следствием рециркуляции, миграции и адгезии макрофагов. Для выяснения влияния непосредственного контакта чумного микроба и фагоцитирующих клеток на изменение их электрофоретической подвижности были проведены эксперименты *in vitro*.

В наших опытах проводилась предварительная адгезия макрофагов на стекло с целью получения монослоя фагоцитов и проведения дальнейшей инкубации с микробными клетками. Для контроля использовались макрофаги, претерпевшие адгезию на стекле в течение того же промежутка времени, что и макрофаги, проинкубированные с *Y.pestis EV*. Установлено, что интактные макрофаги, находясь в адгезированном состоянии, при последующей электрофоретической сортировке разделялись на ряд субпопуляций, обладающих разной электрофоретической подвижностью. Формирование субпопуляций происходило в динамике нашего наблюдения в течение 360 минут. Полученные нами данные свидетельствуют, что при активации макрофагов происходит их разделение на субпопуляции, обладающие различными функциональными свойствами.

Активация различается не только степенью возбуждения индивидуальных клеток, но и масштабом охвата клеточной популяции в целом. В норме активировано небольшое

количество фагоцитов. Взаимодействие макрофагов с микробными клетками *Y.pestis EV* сопровождалось изменениями конфигурации кривой распределения макрофагов по электрофоретической подвижности уже на 30 минуте исследования. В этот период исследования электрофореграмма была представлена одним пиком выхода клеток, соответствующим 46 фракции, где тестировалось 58,3 % макрофагов. Электрофоретическая кривая распределения клеток контроля характеризовалась двумя пиками максимального выхода клеток - в 42 и 46-47 фракциях, в которых содержание макрофагов составило 6.7 % и 82.5 %, соответственно. Начиная с 60-й минуты исследования наблюдается увеличение гетерогенности клеток по электрофоретическим показателям. Клетки распределяются на четыре основные группы по ЭФП, соответственно, в 44; 46,47; 52 и 55 каналах. В 44 фракции тестировалось 5 % клеток; в 46,47 - 30 %; в 52 - 3.2 % и в 55 фракции - 10,7 %. Основная масса макрофагов приходилась на 46-49 каналы с общей численностью клеток 58,6 %. По сравнению с контролем происходило увеличение численности выхода МФ во фракциях, характеризующихся высокой ЭФП.

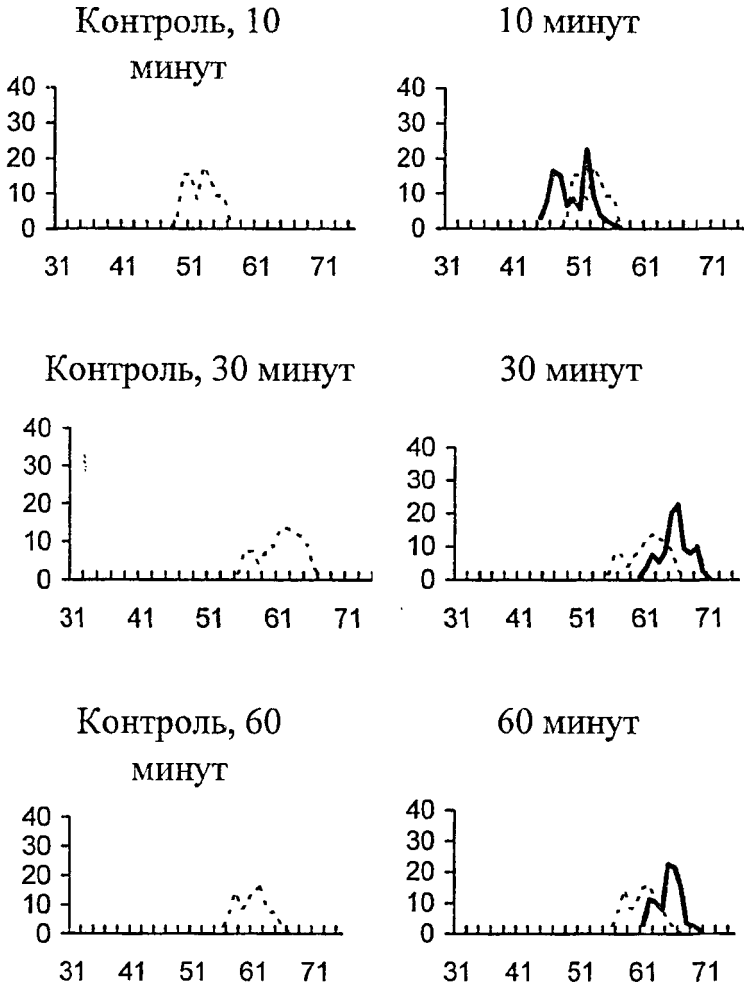
В сравнительном аспекте, а также с целью возможной экстраполяции данных: полученных в эксперименте на организм человека были проведены опыты с использованием моноцитов и нейтрофильных лейкоцитов, выделенных из крови людей. Также как и макрофаги, популяция интактных моноцитов в процессе адгезии на стекло разделяется на субпопуляции, обладающие различной электрофоретической подвижностью.

Взаимодействие моноцитов крови *in vitro* с *Y.pestis EV* приводило к значительным сдвигам в состоянии электрокинетических свойств клеток, выражающиеся в повышении электрофоретической подвижности моноцитов на 10 минуте инкубации и разделение общего пула на три субпопуляции с разными электрофоретическими свойствами (рис.3). На 30 и 60 минуте взаимодействия моноцитов и *Y.pestis EV*, также как и в экспериментах на перитонеальных макрофагах экспериментальных животных, наблюдали снижение ЭФП.

Данные, полученные в экспериментах *in vitro*, свидетельствовали о меньшем влиянии *Y.pestis EV* и его антигенов на электрофоретическую подвижность мононуклеарных фагоцитов, чем непосредственно в живом организме. Вероятно, изменения электрофоретической подвижности мононуклеарных фагоцитов в экспериментах *in vivo* отражают сложный комплекс реакций фагоцитов, обеспечивающих иммунобиологическую перестройку и формирование антиинфекционной резистентности.

Следующий раздел работы был посвящен выяснению взаимосвязи между уровнем электрофоретической подвижности фагоцитирующих лейкоцитов и их функционально-метаболической активностью.

В период взаимодействия нейтрофилов с *Y.pestis EV* наряду со снижением ЭФП, увеличивалась способность нейтрофилов к фагоцитозу. Нейтрофилы, составившие субпопуляцию с наименьшей ЭФП, обладали наиболее высокими показателями фагоцитарной активности (таблица). Через 30 минут инкубации регистрировалось наличие всего одной субпопуляции нейтрофилов, ЭФП которой была снижена по сравнению с контролем. Фагоцитарный индекс составил в среднем 6.75 ± 0.72 микробных клеток на один



Пунктирная линия - клетки, проинкубированные без микробной взвеси; сплошная линия - клетки, проинкубированные в присутствии клеток *Y.pestis EV*. По оси абсцисс - номера фракций; по оси ординат - содержание клеток (%).

Рис.3. Изменение электрофоретической подвижности моноцитов крови человека в различные сроки инкубации их с клетками *Y.pestis EV*.

нейтрофил. Почти все клетки субпопуляции находились в состоянии фагоцитоза (94,2%). Взаимодействие нейтрофилов крови и микробных клеток *Y.pestis EV* в течение 60 минут характеризовалось отсутствием разделения общего пула на субпопуляции и дальнейшим снижением ЭФП. Максимальный выход клеток тестировался в 67 фракции, в которой в основном все нейтрофилы находились в состоянии фагоцитоза (99 %). Число захваченных микробных клеток на один нейтрофил составляло $9,2 \pm 0,37$ ($p < 0,001$).

Таблица. Уровень фагоцитарной активности и значение фагоцитарного индекса электрокинетически гетерогенных субпопуляций нейтрофильных лейкоцитов крови людей при взаимодействии с *Y.pestis in vitro*

| № канала | Сроки исследования | | | | | |
|----------|--------------------|-----------|------------|-----------|-----------|----------|
| | 10 минут | | 30 минут | | 60 минут | |
| | ФА | ФИ | ФА | ФИ | ФА | ФИ |
| 57 | 26.1±3.67 | 0.66±0,26 | | | | |
| 58 | 41.0±1.01 | 2.25±0.11 | | | | |
| 59 | 31.2±2.92 | 1.85±0.06 | | | | |
| 60 | 27.0±3.74 | 1.70±0.33 | | | | |
| 61 | 33.2±3.39 | 1.89±0.39 | 25.2±4.33 | 0.66±0.21 | | |
| 62 | 51.0±1.87 | 2.95±0.09 | 47.0±8.89 | 2.82±0.02 | | |
| 63 | 43.1±2.55 | 2.54±0.25 | 60.0±7.42 | 3.99±0,57 | | |
| 64 | 50.6±1.17 | 3.30±0.12 | 94.2±4.85 | 5.17±0.93 | 71.4±0.98 | 6.4±0.68 |
| 65 | 31.1±4.02 | 2.20±0.18 | 74.0±2.76 | 6.75±0.72 | 78.0±4.36 | 6.2±0.21 |
| 66 | | | 61.4±11.08 | 4.40±0.71 | 85.0±5.24 | 8.0±0.45 |
| 67 | | | 35.0±12.25 | 1.64±0.62 | 99.0±1.01 | 9.2±0.37 |
| 68 | | | 8.4±0.93 | 0.61±0.12 | 100±0.11 | 8.0±0.63 |
| 69 | | | | | 99.0±1.01 | 7.0±0.45 |

ФА - фагоцитарная активность (%); ФИ - фагоцитарный индекс (м.к.)

Из полученных данных видно, что гетерогенность нейтрофильных лейкоцитов проявляется лишь на начальных этапах фагоцитоза. Разделение популяции нейтрофилов, очевидно, связано с метаболическими изменениями. Фагоцитоз чумного микроба не сопровождается разделением общего пула нейтрофилов на субпопуляции, однако, происходит изменение электрофоретической подвижности всей популяции нейтрофилов.

В следующем разделе работы был проведен сопоставительный анализ изменений метаболической активности электрофоретически-гетерогенных субпопуляций моноцитов крови человека под влиянием антигенов чумного микроба. С этой целью изучались: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа – ключевой фермент пентозофосфатного пути, лактатдегидрогеназа – ключевой фермент гликолитического пути, малатдегидрогеназа и сукцинатдегидрогеназа - ферменты цикла Кребса. Обнаруживалась обратная корреляция

между активностью ключевого фермента пентозофосфатного пути обмена углеводов - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и ЭФП моноцитов. Взаимодействие моноцитов с основным соматическим антигеном сопровождалось снижением активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на 10 и 30 минуте взаимодействия (рис.4). Капсульный антиген, напротив, увеличивал ферментативную активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы моноцитов во все сроки исследования и снижал электрофоретическую подвижность клеток.

Инкубация *in vitro* моноцитов крови с капсульным антигеном чумного микроба сопровождалась повышением активности фермента цикла Кребса - малатдегидрогеназы и фермента гликолиза - лактатдегидрогеназы. Интересно отметить, что внутри общего пула выделенных клеток субпопуляции с большей ферментативной активностью характеризовались более высокой ЭФП. Активность сукцинатдегидрогеназы снижалась при взаимодействии моноцитов с антигенами чумного микроба (рис.5). Максимальные активности ключевого регуляторного фермента цикла Кребса идентифицировались в высокоподвижных фракциях. Регистрировалась высокая степень коэффициента корреляции ($r=0.98\pm 0.01$) между активностью сукцинатдегидрогеназы и ЭФП моноцитов.

Таким образом, использование физико-химического метода определения электрофоретической подвижности и биохимических методов определения ферментативной активности позволило дать интегральную общую характеристику изменениям функциональной активности фагоцитирующих клеток при их взаимодействии *in vitro* и *in vivo* с чумным микробом и его антигенами. Полученные данные могут иметь важное значение при оценке иммунобиологических свойств разных штаммов и антигенов чумного микроба.

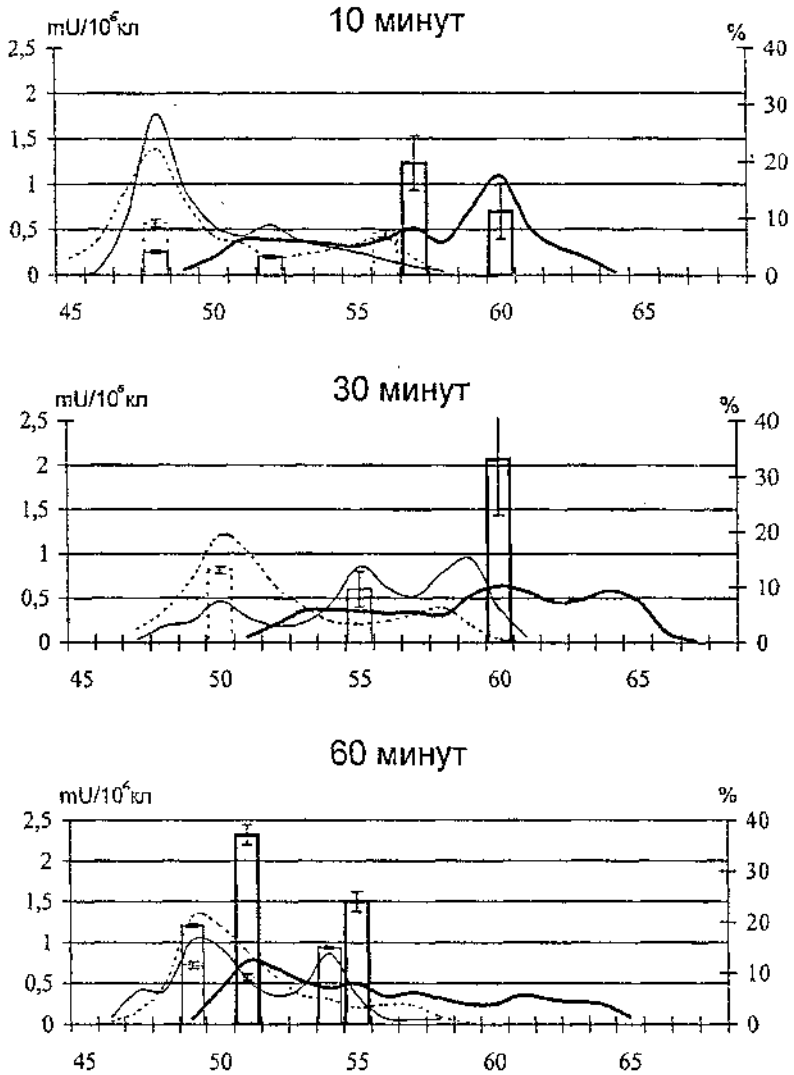
Выводы

1. Иммунизация белых мышей вакцинным штаммом *Y.pestis EV* сопровождается снижением электрофоретической подвижности основного пула перитонеальных макрофагов и появлением электрофоретически гетерогенных популяций.

2. Изменения электрокинетических свойств макрофагов в процессе иммуногенеза к чуме зависят от генотипа животных. Инбредная линия мышей СС57W реагирует меньшим, по сравнению с беспородными, снижением электрофоретической подвижности макрофагов. Выявлены характерные для линии СС57W особенности формирования электрофоретически гетерогенных субпопуляций перитонеальных макрофагов.

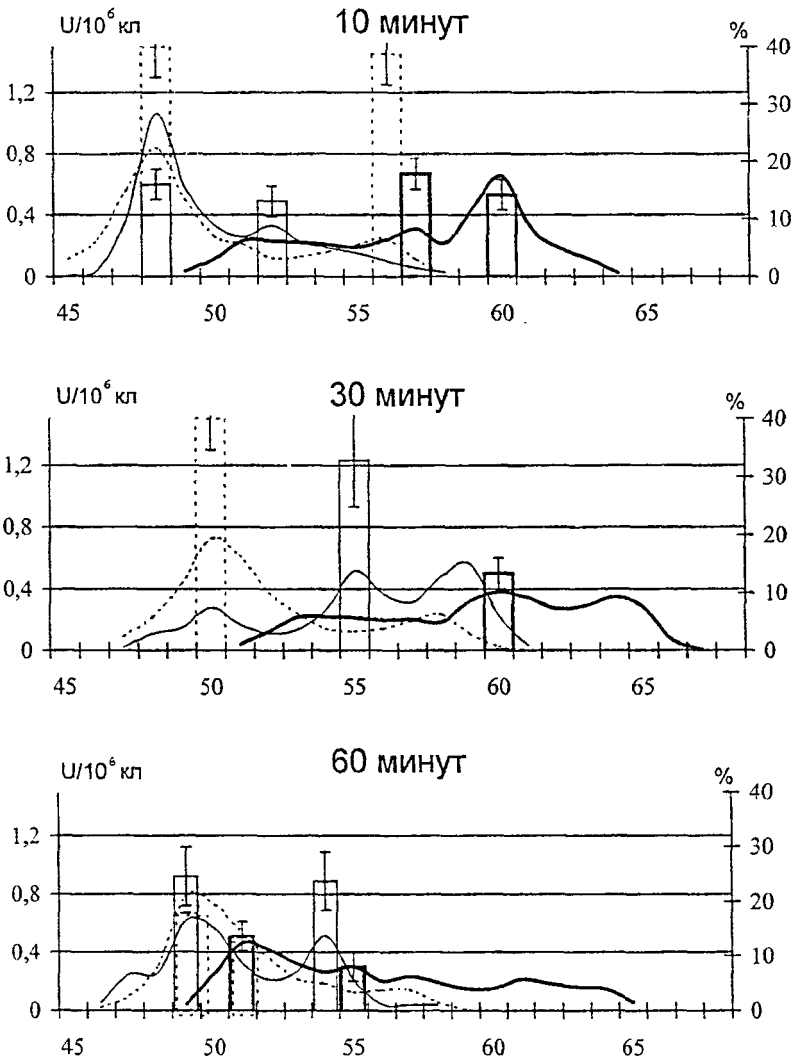
3. Адгезия макрофагов к стеклу, сопровождающаяся активацией клеток, приводит к дифференцированному изменению электрофоретической подвижности популяций фагоцитов. Через 60 минут после адгезии наблюдается выраженное снижение электрофоретической подвижности большинства клеток, сменяющееся повышением через 180 и 360 минут.

4. Взаимодействие *in vitro* макрофагов с клетками *Y.pestis EV* приводит к значительному изменению конфигурации кривой распределения макрофагов по электрофоретической подвижности. На 60 минуте инкубации тестируются до четырех электрофоретически гетерогенных субпопуляций, одна из которых (46-47



Столбики - ферментативная активность ($mU/10^6 \text{ кл}$); линии электрофоретическая подвижность. Пунктирная линия - контроль; сплошная линия - клетки, проинкубированные в присутствии ОСА, жирная - в присутствии капсульного антигена.

Рис. 4. Изменение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы электрокинетически гетерогенных субпопуляций моноцитов крови человека при взаимодействии с антигенами чумного микроба.



Столбики - ферментативная активность ($\text{mU}/10^6$ кл); линии - электрофоретическая подвижность. Пунктирная линия - контроль; сплошная линия - клетки, проинкубированные в присутствии ОСА, жирная - в присутствии капсульного антигена.

Рис.5. Изменение активности сукцинатдегидрогеназы в электрокинетически гетерогенных субпопуляциях моноцитов крови человека при взаимодействии с антигенами чумного микроба.

фракция - 30 % клеток) обладает резко выраженной высокой электрофоретической подвижностью.

5. Иммунизация белых мышей основным соматическим и капсульным антигенами чумного микроба вызывает снижение электрофоретической подвижности основной массы макрофагов, формирующих в большинстве сроков исследования две электрофоретически различающиеся субпопуляции. Капсульный антиген обладает более выраженной, по сравнению с основным соматическим, способностью снижать электрофоретическую подвижность фагоцитов.

6. Макрофаги неиммунизированных морских свинок формируют пять электрофоретически гетерогенных субпопуляций. Иммунизация морских свинок капсульным антигеном сопровождается резким снижением электрофоретической подвижности макрофагов и преобладанием трех электрофоретически различающихся субпопуляций клеток.

7. Адгезия моноцитов крови людей к стеклу приводит к выраженному дифференцированному изменению электрофоретической подвижности популяций фагоцитов. Спустя 30 минут наблюдается снижение электрофоретической подвижности большинства клеток, разделившихся на 2 субпопуляции. Инкубация *in vitro* моноцитов человека с антигенами чумного микроба (капсульным FI и основным соматическим) сопровождается снижением электрофоретической подвижности с формированием характерной кривой распределения клеток по данному свойству.

8. Взаимодействие *in vitro* антигенов чумного микроба с моноцитами крови людей сопровождается снижением их электрофоретической подвижности и увеличением внутриклеточной активности ключевых ферментов пентозофосфатного пути обмена углеводов - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и гиколитического пути - лактатдегидрогеназы. Под влиянием капсульного антигена активность сукцинатдегидрогеназы снижается. Внутри общего пула выделенных моноцитов максимальные ферментативные активности регистрируются в субпопуляциях, характеризующихся более высокой электрофоретической подвижностью.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Стукова Н.Ю., Дроздов И.Г., Попов Ю.А., Шведун Г.П., Самойлова С.В., Кириллина О.А., Булгакова Е.Г., Яшечкин Ю.И., Лазовский Ю.В., Фирстова В.В., Ледванов М.Ю. Генетически-детерминированные факторы иммуногенности и вирулентности.// Иммунология и специфическая профилактика ООИ: Материалы Российской научной конф.-Саратов, 21-23 сентября, 1993.- С.70-71.

2. Ледванов М.Ю., Наумов А.В., Дроздов И.Г., Стукова Н.Ю., Емельянова Н.В., Тихонов С.Н., Лазовский Ю.В., Лоцманова Е.Ю., Фирстова В.В., Клапков С.А., Шведун Г.П., Тараненко Т.М., Брандзишевский Ю.В., Попов Ю.А., Куличенко А.Н., Киреев М.Н., Герасимова К.И., Саяпина Л.В., Анисимова Т.Н., Кравцов А.Л., Самойлова С.В., Яшечкин Ю.И. Механизмы формирования клеточного противочумного иммунитета.// Актуальные

пробл. профилактик. особо опасных и природно-очаговых инф. болезн. - Иркутск.- 1994.- 2.87-88.

3. Фирстова В.В., Стукова Н.Ю., Лазовский Ю.В., Тихомирова Л.А., Ледванов М.Ю. Тестирование функциональной активности макрофагов в процессе иммуногенеза к чуме с использованием свободного распределительного клеточного электрофореза.//Межгос. научн. конф., посвящен. 100-летию открытия возб. чумы.- Алма-Ата.- 6-7 сент.,1994.- С.163.

4. Stukova N.Yu., Firstova V.V., Lazovski Yu.V. Functional activity test by carrier-free electrophoresis of subpopulation of phagocytic mononuclear cells.// International journal of immunorehabilitation. Abstracts of the 1st International congress of immunorehabilitation. - 1994, Number 1.- Supplement.-P.339.

5. Стукова Н.Ю., Шведун Г.П., Тараненко Т.М., Гусева Н.П., Фирстова В.В., Дроздов И.Г., Ледванов М.Ю. Функциональное состояние иммунокомпетентных клеток при взаимодействии с чумным микробом и его антигенами. // Ставрополь.- 11.05.95.

6. Фирстова В.В., Стукова Н.Ю., Тараненко Т.М., Лазовский Ю.В., Тихомирова Л.А., Ледванов М.Ю. Изменение электрокинетических свойства клеток системы фагоцитирующих мононуклеаров в процессе иммуногенеза к чуме.// Пробл. ООИ.- Саратов 1995.- Вып.2.- С. 159-167.

7.Фирстова В.В., Стукова Н.Ю., Шведун Г.П., Ледванов М.Ю. Электрофоретическая подвижность перитонеальных макрофагов морских свинок и мышей в процессе формирования иммунитета к чуме.// Научн. конф. "Актуальные вопр. совр. медицины",24-26 апр.,1996.- Бишкек.

8.Фирстова В.В., Стукова Н.Ю., Шведун Г.П., Ледванов М.Ю. Изменение электрофоретической подвижности мононуклеарных фагоцитов в процессе формирования иммунитета при чуме.// Тез. Конф.: «Эколого-эпидем. Надзор за природно-очаговыми инф. В Северном Прикаспии».- Астрахань, 1996.- С.162.

9.Фирстова В.В., Стукова Н.Ю., Чалык Н.Е., Ледванов М.Ю. Изменение активности ферментов углеводного обмена и электрокинетических показателей моноцитов крови человека при взаимодействии с антигенами чумного микроба.// Гомеостаз и инф. Прог.: Тез. Докл. Междунар. Конф.- Саратов, 1996.- С337.

10.Фирстова В.В., Стукова Н.Ю., Чалык Н.Е., Ледванов М.Ю. Фагоцитарная активность в электрокинетически гетерогенных популяциях нейтрофилов крови человека при взаимодействии с чумным микробом.// Гомеостаз и инф. Прог.: Тез. Докл. Междунар. Конф.- Саратов, 1996.- С336.

11.Фирстова В.В., Стукова Н.Ю., Ледванов М.Ю. Современные представления об электрокинетических свойствах иммунокомпетентных клеток. Российский. н.-и. противочумн. ин-т «Микроб».- Саратов, 1996.- 27с. – Библиогр. 83 назв.- Рус.- Деп. В ВИНИТИ 14.01.97, №111-В97.

12.Фирстова В.В., Стукова Н.Ю., Мелешенко Н.Ю. Использование метода распределительного клеточного электрофореза для прогнозирования течения ин-

фекционных заболеваний// Самара, «Съезд акушеров-гинекологов».- 1997(октябрь).

13. Фирстова В.В., Стукова Н.Ю., Чалык Н.Е., Мелещенко Н.Ю., Крушещницкая Е.Б., Ледванова Т.Ю., Корякина Е.В., Цека Ю.Б. Разработка критериев оценки и прогноза течения различных заболеваний с использованием метода клеточного электрофореза в свободном токе жидкости// Матер. Н.-практ. Конф., посвящ. 100-летию образов противочумн. Службы России.- Саратов, 1997.- Т.1- С.254.

14. Стукова Н.Ю., Емельянова Н.В., Фирстова В.В., Мелещенко Н.Ю., Горькова А.В., Ледванов М.Ю. Разработка критериев оценки и прогноза иммунотерапии различных заболеваний с использованием препаратов тимуса// Матер. Науч. Конф. "Человек и здоровье С.-Петербург, 1997 (25-30 мая).- дискета.

15. Емельянова Н.В., Стукова Н.Ю., Цека Ю.А., Фирстова В.В., Клапков С.А., Зайцева И.А., Мелещенко Н.Ю., Ледванов М.Ю. Изучение и коррекция иммунодефицитных состояний у больных дифтерией// Матер. Научно-практ. Конф., посвящ. 100-летию образов противочумн. службы России.- Саратов, 1997.- Т.1.- С.209.

16. Стукова Н.Ю., Шведун Г.П., Фирстова В.В., Горькова А.В., Мелещенко Н.Ю., Ледванов М.Ю. Значение процессов фагоцитоза в формировании противочумного иммунитета// Матер. Научно-практ. Конф., посвящ. 100-летию образов противочумн. службы России.- Саратов, 1997.- Т.1.- С.245.

17. Емельянова Н.В., Стукова Н.Ю., Цека Ю.А., Фирстова В.В., Клапков С.А., Зайцева И.А., Мелещенко Н.Ю., Ледванов М.Ю. Изучение и коррекция нарушений функционального состояния лимфоцитов у детей при инфекционных кишечных заболеваний// Матер. Научно-практ. Конф., посвящ. 100-летию образов противочумн. службы России.- Саратов, 1997.- Т.1.- С.210.