УДК 616.981.452:616.9

Д.А.Будыка, Н.В.Абзаева, С.М.Руднев, Г.Ф.Иванова, А.А.Фисун, С.Е.Гостищева, А.И.Бондаренко

БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ, ПРИВИТЫХ ПРОТИВ ЧУМЫ, И В РАЗЛИЧНЫХ СХЕМАХ ИНФИЦИРОВАНИЯ ЧУМНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Проведены исследования динамики факторов бактерицидной активности (катионные белки и миелопероксидаза) в полиморфно-ядерных лейкоцитах (ПМЯЛ) периферической крови беспородных белых мышей, иммунизированных против чумы и при развитии чумной инфекции в различной модификации инфекционного процесса. Устойчивость к чуме у белых мышей коррелирует с защитной функцией ПМЯЛ, обеспечиваемой главным образом МПО-системой при вспомогательном участии КБ-системы. Изменение уровня активности МПО и КБ ПМЯЛ может служить косвенным показателем степени устойчивости белых мышей к чумной инфекции.

Ключевые слова: полиморфно-ядерные лейкоциты, миелопероксидаза, катионные белки, иммуногенность, феномен «переживания».

Введение в организм живой чумной вакцины или вирулентного штамма чумного микроба влечет за собой развитие ответной реакции, механизм которой описан достаточно подробно. Создание поствакцинального иммунитета при этом обеспечивают гуморальные и клеточные факторы [9]. При этом считается общепризнанным, что иммунитет при чуме обусловлен, прежде всего, клеточными факторами специфической и неспецифической защиты, в том числе фагоцитарными элементами.

При изучении природы противочумного иммунитета уже первые исследователи отметили важное значение фагоцитоза (фагоцитирование чумных микробов макро- и микрофагами). Было установлено, что при чумной инфекции в неиммунном восприимчивом организме фагоцитоз носит незавершенный характер, что приводит к размножению возбудителя, генерализации инфекции и гибели организма. В иммунном организме имеет место завершенный фагоцитоз так же, как и у естественно резистентных к чуме животных.

Несмотря на важное значение фагоцитоза для конечного исхода чумной инфекции необходимо учитывать, что на стадии захвата микробов фагоцитоз относится к неспецифическим факторам защиты, обеспечивающим состояние «иммунологического гомеостаза», и во многом зависит от функционирования специфических механизмов.

Установлено, что в процессе иммуногенеза при чуме происходит перестройка кислородзависимого метаболизма, которая имеет периодический (фазный) характер. Изучение кислородзависимого метаболизма фагоцитов проводится по тесту восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Отражая реакцию ферментных систем полиморфно-ядерных лейкоцитов, ответственных за их цитотоксический потенциал, НСТ-тест позволяет оценить бактерицидный потенциал этого пула лейкоцитов. Показана корреляционная связь между интенсивностью НСТ-теста и способностью лейкоцитов к завершенному фагоцитозу. НСТ-тест можно использовать как один из показателей противочумного иммунитета.

Однако главными факторами бактерицидной активности систем полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) являются кислородзависимая миелопероксидаза (МПО) и кислороднезависимые неферментные катионные белки (КБ). Для оценки инфекционного воздействия, а также эффективности бактерицидной защиты при иммунизации и заражении чумными микробами нами была исследована динамика факторов бактерицидной активности в полиморфно-ядерных лейкоцитах периферической крови беспородных белых мышей.

Материалы и методы

Показатели МПО и КБ определяли в ПМЯЛ периферической крови беспородных белых мышей. Кровь брали из хвостовой вены в разные сроки исследования, делали мазки, обеззараживали в смеси Никифорова и окрашивали на КБ по методу В.Е.Пигаревского [5] и на МПО, пользуясь методикой В.Б.Лецкого [3].

Проведены контрольные исследования динамики изменения исследуемых показателей у животных, инфицированных различными дозами вирулентного штамма чумного микроба *Y. pestis* 461, 1 ЛД которого равняется 50 м.к. Белых мышей в количестве 24 заражали 2–3, 10, 50 и 250 м.к. по 6 мышей на дозу (1, 2, 3 и 4-я группы). У всех выживших после инфицирования животных брали кровь на 2, 7 и 10-е сутки протекания инфекционного процесса. Затем были смоделированы два различных типа инфекционного процесса, в которых проведено исследование аналогичных показателей.

Первоначально искомые показатели у мышей исследовали согласно методике определения иммуногенности коммерческого препарата чумной вакцины (штамм *Yersinia pestis EV* линии НИИЭГ), изложенной в нормативной документации (НД) на препарат

[6]. Экспериментальных животных иммунизировали подкожно дозами $8 \cdot 10^2$, $4 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$ и 10^5 микробных клеток (м.к.), исходя из ранее определенного количества их в препарате вакцины. Кровь исследовали на 7, 14 и 21-е сутки после иммунизации. На 21-е сутки после вакцинации проводили подкожное заражение 200 ЛД вирулентного штамма чумного микроба штамма *Y. pestis* 461 (1 ЛД=50 м.к. для белых мышей). Наблюдение за зараженными животными вели в течение 21 сут. На 1, 3, 7, 14 и 21-е сутки после заражения у выживших животных в мазках крови определяли активность МПО и содержание КБ.

Далее провели идентичные исследования по активности бактерицидных систем полиморфноядерных лейкоцитов в феномене «переживания» [1]. Последний характеризует иммуногенность вакцинного штамма, использованного в смеси с вирулентным. Четырем группам животных (I К, II К, III К и IV К) вводили комбинацию из вакцины чумной (10^7 м.к.) и 461 штамма (2, 20, 200 и 2000 ЛД соответственно группам). Активность МПО и содержание КБ определяли на 1, 3, 7, 14 и 21-е сутки после заражения.

Все данные по бактерицидной активности ПМЯЛ обработаны статистически. У интактных животных показатели МПО составили 1,09±0,07; КБ – 1,6±0,03.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал, что инфицирование существенно влияет на исследуемые показатели ПМЯЛ. Отмечено, что содержание КБ в ПМЯЛ периферической крови достоверно снижается во всех группах, особенно в период массовой гибели животных на 3–5-е сутки, когда в группах, инфицированных летальными дозами, падеж составил 100 %. По мере затухания инфекционного процесса происходит постепенное повышение уровня КБ у выживших животных (0,95±0,03; 1,04±0,12 в 1-й и 2-й группах соответственно). Снижение активности МПО также сменяется повышением КБ на 10-е сутки (1,11±0,08 и 1,04±0,02 соответственно) до уровня контроля (табл. 1).

По результатам проведенных исследований, выявлено, что заражение чумой вызывает снижение показателей бактерицидных систем ПМЯЛ интактных белых мышей пропорционально силе инфекционного воздействия, причем более адекватно реагирует кислородзависимая МПО-система. У мышей 1–2-й групп, инфицированных сублетальными дозами 2–3 и 10 м.к. штамма *Y. pestis,* 461 значение КБ и МПО после падения постепенно нарастало. Лишь в период основной гибели животных тенденция к падению активности бактерицидных систем была наиболее выражена и, по-видимому, отражала истощение защитного потенциала ПМЯЛ, что более всего проявилось у мышей 3 и 4-й групп, инфицированных 50 и 250 м.к. вирулентного штамма.

Анализ изменения активности бактерицидных систем у иммунных животных после заражения их вирулентной культурой показал, что происходит закономерное снижение содержания КБ во всех группах по сравнению с их значением к моменту заражения, особенно на 3–7-е сутки, что, по-видимому, связано с разгаром инфекционного процесса. В динамике активности МПО у данных животных также отмечается наименьшее ее значение в период развития чумной инфекции, особенно на 3-и и, отчасти, на 7-е сутки после инфицирования. На 14 и 21-е сутки четко прослеживается разделение подопытных животных на три группы. В первой группе, где животные проиммунизированы наименьшей дозой (800 м.к.), происходит снижение уровня МПО до 0,98±0,05 достоверно к третьей группе (t = 2,3), куда объединены животные, получившие эффективные иммунизирующие дозы ($2 \cdot 10^4$ и 10^5 м.к.), показатель МПО у которых превысил контрольный и составил 1,13±0,03. Данная тенденция прослеживается в картине падежа животных. При этом основной падеж животных пришелся на 7–10-е сутки и составил 70 % для первой группы и 28–30 % для третьей. Во второй, промежуточной, группе, где животные были проиммунизированы дозой $4 \cdot 10^3$ м.к., падеж составил 50 %, а показатели МПО достигли 1,02±0,02, при этом недостоверность изменения данного показателя по сравнению с контролем (1,09±0,07) объясняется, скорее всего, ин-

Таблица 1

Бактерицидная активность ПМЯЛ белых мышей, зараженных вирулентным штаммом чумного микроба

Сроки исследования, сут		Группы животных / заражающая доза, м.к.			
		1 / 2–3	2 / 10	3 / 50	4 / 250
2	КБ	1,09±0,03	1,20±0,06	0,99±0,02	0,98±0,03
	МПО	0,5±0,03	0,68±0,03	0,68±0,03	0,78±0,02
7	КБ	0,89±0,01	0,96±0,03	-	-
	МПО	0,76±0,05	0,82±0,03	-	-
10	КБ	0,95±0,03	1,04±0,12	-	-
	МПО	1,11±0,08	1,04±0,02	-	-
Количество животных в опыте		6	6	6	6
Количество выживших животных		4	2	0	0
% выживших (M ± m)		66,7±20,8	33,3±21,1	0	0

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3, 4 контроль: МПО – 1,09±0,07; КБ – 1,6±0,03.

Таблица 2

Бактерицидная активность ПМЯЛ белых мышей, иммунизированных против чумы, после заражения чумной инфекцией

Сроки исследования, сут		Группы животных / дозы вакцины, м.к.			
		I / $8\cdot10^2$	II / $4\cdot10^3$	III / $2\cdot10^4$	IV / 10^5
1	КБ	1,26±0,11	1,38±0,11	1,19±0,04	1,21±0,07
	МПО	0,78±0,03	0,73±0,04	0,61±0,05	0,96±0,13
3	КБ	1,18±0,03	1,14±0,06	1,13±0,05	1,30±0,11
	МПО	0,67±0,05	0,66±0,05	0,66±0,05	0,61±0,07
7	КБ	1,05±0,02	1,16±0,11	1,30±0,05	1,18±0,08
	МПО	0,72±0,03	0,59±0,04	0,73±0,05	0,71±0,06
14	КБ	1,14±0,05	1,18±0,03	1,24±0,09	1,22±0,11
	МПО	0,80±0,04	0,88±0,05	0,80±0,04	0,78±0,04
21	КБ	1,14±0,02	1,19±0,08	1,21±0,03	1,21±0,02
	МПО	0,98±0,05	1,02±0,02	1,14±0,04	1,12±0,02
Количество животных в опыте		15	14	10	11
Количество выживших животных		5	7	7	9
% выживших (M ± m)		30,2±12,2	50±13,9	70±15,3	81,8±12,2

Примечание. Номера групп животных в таблицах 2 и 3 идентичны.

дивидуальной устойчивостью биомодели к чумной инфекции. Что касается КБ, то первая группа дает достоверное снижение показателя (1,14±0,02) как по сравнению с контрольным значением (t = 12,8), так и по сравнению с третьей группой (t = 2,5), показатель которой составил 1,21±0,03. Во второй группе, где выжило 50 % животных, уровень КБ промежуточный (1,19±0,08), при этом достоверно его значение только по сравнению с контролем. В целом же уровень КБ остается достоверно ниже показателя как на момент заражения, так и у интактных животных (табл. 2).

Таким образом, после заражения иммунных к чуме белых мышей выявлена защитная функция бактерицидных факторов ПМЯЛ периферической крови, обеспечиваемая обеими системами: МПО и КБ. При этом роль МПО-системы, по нашим данным, предпочтительней, хотя система КБ проявляла склонность к более серьезному истощению и не восстанавливалась к 21-м суткам – продуктивной фазе поствакцинального иммунитета против чумы. Такая динамика несомненно свидетельствует в пользу задействования в бактерицидной защите ПМЯЛ и системы КБ.

Что касается изменения исследуемых показателей ПМЯЛ после иммунизации, то, хотя содержание КБ в ПМЯЛ периферической крови мышей снижается во всех группах, у животных, которым вводили 10^5 м.к. вакцины, указанное снижение было менее выраженным. У данных животных к 21-м суткам происходило даже восстановление до контрольных величин. В общем плане также просматривается увеличение содержания КБ к 21-м суткам после иммунизации, однако указанные значения остаются статистически ниже аналогичного показателя контроля. Также закономерно на иммунизацию реагирует кислородзависимый фактор бактерицидности – МПО. Вначале происходит подъем, хотя и не равнозначно у разных групп мышей, активности фермента, затем к 14-м суткам активность МПО у всех мышей падает до контрольных величин, к 21-м отмечено максимальное снижение активности МПО в ПМЯЛ периферической крови (табл. 3).

Таким образом, выявлено, что иммунизация в соответствии с НД [6] вызывает снижение показателей бактерицидных систем ПМЯЛ у белых мышей в процессе формирования поствакцинального иммунитета к чуме.

Смоделированный инфекционный процесс в феномене «переживания» показал довольно четкое и стереотипное реагирование обоих изучаемых факторов бактерицидности ПМЯЛ крови белых мышей в данной экспериментальной системе. Указанное воздействие сопровождалось закономерным существенным снижением уровня КБ в динамике развития инфекционного процесса. Сопряженно реагирует и МПО система ПМЯЛ, закономерно повторяя динамику снижения активности на 1, 3-е и особенно на

Таблица 3

Бактерицидная активность ПМЯЛ белых мышей, привитых против чумы

Сроки исследования, сут		Группы животных / дозы вакцины, м.к.			
		I / $8\cdot10^2$	II / $4\cdot10^3$	III / $2\cdot10^4$	IV / 10^5
7	КБ	1,13±0,09	1,16±0,05	1,13±0,09	1,21±0,09
	МПО	1,78±0,01	1,13±0,05	1,19±0,11	1,34±0,05
14	КБ	1,27±0,06	1,30±0,04	1,21±0,1	1,19±0,1
	МПО	1,30±0,1	1,22±0,09	1,05±0,06	1,24±0,13
21	КБ	1,27±0,09	1,32±0,1	1,19±0,05	1,38±0,1
	МПО	0,70±0,08	0,88±0,13	0,78±0,09	0,78±0,05

Таблица 4

Бактерицидная активность ПМЯЛ белых мышей в феномене «переживания»

Сроки исследования, сут		Группы животных			
		I К	II К	III К	IV К
1	КБ	1,21±0,09	1,10±0,02	1,06±0,05	1,16±0,05
	МПО	0,79±0,08	0,83±0,03	0,84±0,02	0,86±0,06
3	КБ	1,13±0,03	1,10±0,05	1,05±0,03	1,08±0,00
	МПО	0,64±0,04	0,74±0,04	0,66±0,09	0,83±0,02
7	КБ	1,11±0,03	1,11±0,11	1,02±0,02	1,00±0,00
	МПО	0,72±0,04	0,66±0,05	0,53±0,07	0,72±0,00
14	КБ	1,08±0,03	1,17±0,06	1,00±0,00	1,08±0,00
	МПО	0,73±0,05	0,83±0,04	0,93±0,09	0,86±0,00
21	КБ	1,21±0,06	1,12±0,04	1,18±0,13	1,08±0,00
	МПО	0,96±0,09	0,95±0,02	1,15±0,05	1,28±0,00
Количество животных в опыте		6	6	6	6
Количество выживших животных		5	4	3	1
% выживших (M ± m)		83,3±16,7	66,7±21,1	50±22,4	16,7±16,7

7-е сутки наблюдения. На 10–14-е сутки произошел основной падеж биомодели, совпавший с истощением потенциала бактерицидной активности ПМЯЛ. У выживших животных постепенно нарастал уровень как КБ, так и МПО, особенно на 21-е сутки наблюдения, при этом активность МПО на 14-е сутки уже достигала ее величины на старте инфекционного воздействия (через 1 сут), а на 21-е сутки активность ферментной системы полностью восстанавливалась до контрольных (интактных) показателей (табл. 4).

При этом выявлена интересная закономерность: в группах животных, получивших наименьшее количество вирулентных микробов в смеси I К и II К (10^2 и 10^3 м.к.), показатели МПО возросли сравнительно умеренно (0,96±0,09 и 0,95±0,02 соответственно), а устойчивость к инфекции была наивысшей. В то же время незначительный процент выживших мышей в группах III К и IV К, инфицированных соответственно 10^4 и 10^5 м.к., отреагировал значительно более высокими показателями МПО 1,15±0,05 и 1,28±0,0, что, возможно, свидетельствует об интегрирующем воздействии вирулентного, либо вакцинного штаммов в разных фазах эксперимента. То есть при совместном введении вирулентных и вакцинных микробов выявлена стереотипная реакция исследуемых показателей защитной системы организма белых мышей, реализуемая на уровне бактерицидных факторов (КБ и МПО) ПМЯЛ крови животных.

Следовательно, в эксперименте по изучению иммуногенности живой чумной вакцины показатель для КБ на 21-е сутки составил 1,3, а активность МПО в эти сроки была ниже 1,0, но выше 0,7 (соответствует минимальной иммунизирующей дозе 800 м.к.). При заражении иммунными оказались мыши с показателями КБ через 3 недели не менее 1,21 и с активностью МПО выше 1,0. Очень близкие показатели оказались в эти же сроки и в феномене «переживания»: КБ не менее 1,1, а активность МПО у выживших животных близка к 1,0, причем у устойчивых к высоким дозам инфекции в смеси – превышает ее.

Канонические взгляды на фагоцитоз были обусловлены эффективностью захвата и внутриклеточного инактивирования микробного агента бактерицидными системами фагоцитов с последующей утилизацией поглощенных микробов, убитых бактерицидными факторами, с помощью гидролитических ферментов. Известно, что бактерицидное действие фагоцитирующих клеток определяется системами ферментной и неферментной природы, активность которых может быть обусловлена зависимыми и независимыми от кислорода механизмами [4]. К кислородзависимым факторам, кроме вышеназванной МПО, принадлежат кислородные радикалы – синглетный кислород ($^{-}O_2$), супероксидный анион (O_2^{-}), гидроксильный радикал (OH^{-}), пероксид водорода (H_2O_2), галогены. К кислороднезависимым системам бактерицидности, кроме КБ, относятся лизоцим, трансферрин, лактоферрин, молочная кислота.

В наших экспериментах главным кислородзависимым фактором бактерицидности ПМЯЛ явилась МПО. В основе механизма бактерицидного действия МПО лежит процесс галогенизации белков бактерий, который осуществляется только в присутствии пероксида водорода, образующегося в результате окисления глюкозо-6-фосфата гексозомонофосфатным путем, и галогенов, например йода, содержащегося в плазме крови. Нами установлена также важная роль КБ в противочумной защите у белых мышей, которые, адсорбируясь на поверхности бактерий, вступают в электростатическое взаимодействие с анионными компонентами, что приводит к нарушению структуры и функции мембран и гибели бактериальной клетки.

В свое время была установлена зависимость между содержанием КБ и активностью МПО в ПМЯЛ периферической крови и силой естественного иммунитета к чуме у разных видов животных из Центрально-Кавказского природного очага чумы [7,

8]. Установлено также, что в процессе иммуногенеза при чуме происходит перестройка кислородзависимого метаболизма фагоцитов, исследованная в тесте восстановления нитросинего тетразолия [9].

Другими словами, устойчивость к чуме у белых мышей коррелирует с защитной функцией ПМЯЛ, обеспечиваемой главным образом МПО-системой, при вспомогательном участии КБ-системы, показатели которых могут служить оценкой эффективности иммунизации животных против чумы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Будыка Д.А.* Изучение иммуногенности противочумных профилактических препаратов в феномене «переживания». – Пробл. особо опасных инф. 2001; 81:128–33.

2. *Вихоть Н.Е., Пастер Е.У.* Бактерицидная активность фагоцитирующих клеток. В кн.: Иммунология: Практикум. Киев; 1989. С. 275–80.

3. *Лецкий В.Б,* редактор. Цитоэнзимохимические исследования лейкоцитов. Возрастные колебания цитохимических показателей. Метод. рекомендации. 1973. 32 с.

4. *Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вихоть Н.Е.* Иммунология: практикум. Киев: Выща школа; 1989. 304 с.

5. *Пигаревский В.Е.* Зернистые лейкоциты и их свойства. М.; 1978. 128 с.

6. Промышленный регламент № 01897080-01-04 на производство Вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Ставрополь; 2004. 215 с.

7. *Руднев С.М., Локтев Н.А.* К вопросу о механизме естественной резистентности к чуме полуденных песчанок и горных сусликов Центрального Кавказа. В кн.: Организация эпиднадзора при чуме и меры ее профилактики: Матер. межгос. науч.-практ. конф. Алма-Ата; 1992. Т. 1. С. 142–4.

8. *Руднев С.М., Локтев Н.А., Дальвадянц В.Г.* Определение уровня естественного иммунитета по состоянию бактерицидных систем полиморфно-ядерных лейкоцитов. В кн.: Иммунология и специфическая профилактика ООИ: Матер. Российской науч. конф.; 21–23 сентября 1993 г.; Саратов. Саратов; 1993. С. 81–3.

9. Руководство по профилактике чумы. Саратов; 1992. 279 с.

Об авторах:

Будыка Д. А., Абзаева Н.В., Руднев С.М., Иванова Г.Ф., Фисун А.А., Гостищева С.Е., Бондаренко А.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. Тел./факс: (865-2) 26-11-21; 26-20-50. E-mail: admnip@mail.stv.ru

D.A.Budyka, N.V.Abzaeva, S.M.Rudnev, G.F.Ivanova, A.A.Fissun, S.E.Gostischeva, A.I.Bondarenko

Bactericidal Activity of Polymorphonuclear Blood Leucocytes of White Mice Vaccinated Against Plague and in Different Schemes of Introduction of Plague Infection

Stavropol Anti-Plague Research Institute

Investigated was dynamics of germicidal activity factors (cationic proteins and myeloperoxidase) in polymorphonuclear leucocytes (PMNL) of peripheral blood of white mice immunized against plague and in the course of plague infection in different modifications of infectious process. Plague resistance in white mice was shown to correlate with PMNL protective function, the latter being provided mainly by myeloperoxidase system supported by cationic proteins system. The alteration of activity level of myeloperoxidase and cationic proteins in PMNL may be considered as indirect index of white mice plague resistance.

Key words: polymorphonuclear leucocytes, myeloperoxidase, cationic protein, immunogenicity, phenomenon of “survival”.

Authors:

Budyka D.A., Abzaeva N.V., Rudnev S.M., Ivanova G.F., Fissun A.A., Gostischeva S.E., Bondarenko A.I. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 09.02.09.