

центном содержании в крови Т- и В-лимфоцитов не наблюдалось. В то же время выявлено достоверное увеличение содержания иммуноглобулина М с 1,05 до 1,4 г/л при отсутствии значимого возрастания IgG (табл.). Подобные изменения свидетельствуют об ослабленной иммунной реактивности родильниц, о недостаточности ее Т-клеточного звена и перенапряжении гуморального иммунитета, что и обуславливает стертую клиническую картину.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о выраженном иммуностимулирующем действии препарата "Дибикор" в комплексном лечении родильниц с послеродовым эндометритом. Дибикор не оказывает побочных действий. Новый комплекс лечения обеспечивает прерывание воспалительного процесса в течение 5–6 дней, предупреждает развитие тяжелых форм эндометрита, сокращает на 2,8 койко-дня пребывание родильниц в стационаре, что

имеет большое медицинское и социальное значение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдурахманова Ф.М., Исмаилова Т.Д., Умарова Н.Г. и др. // Матер. Всерос. форума "Мать и дитя". – М., 2005. – С. 7–8.
2. Басиладзе Е.Н. // Матер. Всерос. форума "Мать и дитя". – М., 2005. – С. 27–28.
3. Елизарова Е.П. Дибикор: пособ. для врачей. – М., 2004. – 30 с.
4. Меджидова Д.Р. // Матер. съезда акушеров-гинекологов Южн. Федеральн. округа. – Ростов-н/Д, 2005. – С. 86–88.
5. Пухальский А.Л., Кузьменко Л.Г. Основы общей иммунологии: метод. пособ. по курсу клинич. иммунологии. – М.: Academia, 1998. – 56 с.
6. Серов В.Н., Фомин М.Д., Каншина Л.Г. и др. // Матер. Всерос. форума "Мать и дитя". – 2002. – С. 538–542.
7. Токова З.З., Мекша Ю.В. // Матер. Всерос. форума "Мать и дитя". – М., 2005. – С. 257.
8. Тохиян А.А., Ковтун О.Г., Карапетян Т.Э. // Матер. Всерос. форума "Мать и дитя". – М., 2005. – С. 656.

УДК 576.8.097.29

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОКИН-ИНДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОВ БУРКХОЛЬДЕРИЙ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ

О.Б. Прошина, С.И. Жукова, Н.Н. Пивень, Н.П. Храпова, И.В. Авророва, Н.М. Дрефс
Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Целью работы явилось изучение цитокин-индуцирующей активности антигенов возбудителя мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) и близкородственного непатогенного вида буркхольдерий (*Burkholderia thailandensis*). Была изучена активность лимфокинов и монокинов, полученных *in vitro* на лимфоцитах и макрофагах мышей BALB/c, индуцированных водно-солевыми экстрактами буркхольдерий. Показана взаимосвязь между защитными свойствами антигенов буркхольдерий и некоторыми показателями их цитокин-индуцирующей активности (уровнем экспрессии Fc-рецепторов на нейтрофилах, фагоцитарной активностью макрофагов и цитотоксической активностью ФНО- α для клеток мышинных фибробластов L-929).

Ключевые слова: мелиоидоз, иммунитет, цитокины, антигены буркхольдерий.

COMPARISON OF CYTOKINE-INDUCING ACTIVITY OF DIFFERENT TYPES OF BURKHOLDERIA'S ANTIGENS

O.B. Proshina, S.I. Zukova, N.N. Piven, N.P. Khrapova, I.V. Avrorova, N.M. Drefs

Abstract. The purpose of this work was to study the cytokine-inducing activity of antigens of the melioidosis agent (*Burkholderia pseudomallei*) and its nonpathogenic type (*Burkholderia thailandensis*). In experiments *in vitro* on BALB/c mice macrophages and lymphocytes induced by water-salt extracts of Burkholderias the activity of lymphokines and monokines was studied. The interrelation between the protective properties of Burkholderia's antigens and some parameters of its cytokine-inducing activity (the level of expression of Fc-receptors on neutrophils, phagocytic activity of macrophages and cytotoxic activity of TNF- α for mice fibroblasts L-929) was shown.

Key words: melioidosis, immunity, cytokines, Burkholderia's antigens.

Мелиоидозная инфекция относится к категории особо опасных и характеризуется высокой летальностью и резистентностью к антибиотикотерапии, особенно при хроническом течении. Специфическая профилактика мелиоидоза пока не разработана, хотя научные исследования в этом направлении продолжают более пятидесяти лет. Механизмы иммунитета к мелиоидозу до

сих пор остаются не вполне ясными, в том числе и закономерности цитокиновой иммунорегуляции [3, 4], что серьезно затрудняет разработку эффективной вакцины.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение цитокин-индуцирующей активности различных антигенных комплексов возбудителя

(18)

мелиоидоза и ее связи с протективными свойствами антигенов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве продуцентов цитокинов (монокинов и лимфокинов) были использованы макрофаги (Мф) перитонеального экссудата (ПЭ) и лимфоциты селезенки мышей BALB/c. Индукторами цитокинов служили водно-солевые экстракты (ВСЭ) буркхольдерий: *B.pseudomallei* C-141 (умеренно вирулентный штамм возбудителя мелиоидоза – АГ1), *B.pseudomallei* 100 (высоковирулентный штамм возбудителя мелиоидоза – АГ2), *B.thailandensis* 251 (непатогенный близкородственный вид буркхольдерий – АГ3). Клетки-продуценты примировали всеми ВСЭ в дозе 10 мкг/мл для получения лимфокинов 48 ч, монокинов – 24 ч. По окончании срока инкубации супернатанты центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин, фильтровали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм и замораживали при –20 °С до исследования.

Тестирование биологической активности лимфокинов проводили на перитонеальных Мф мышей. Изучали влияние лимфокинов на экспрессию Fc-рецепторов на поверхности Мф, на способность вызывать реакцию исчезновения Мф (РИМ) из брюшной полости, а также на фагоцитарную активность Мф. Биологическую активность монокинов оценивали на нейтрофилах ПЭ мышей. Определяли способность монокинов модулировать хемотаксис Нф и экспрессию Fc-рецепторов. Кроме того, определяли активность ФНО-α, продуцируемого Мф на перевиваемой клеточной линии мышинных фибробластов L-929.

Фагоцитарную активность Мф изучали хемилюминесцентным методом [2]. Об экспрессии Fc-рецепторов (FcR) судили по розеткообразованию с эритроцитами барана, опсонизированными противозритроцитарными кроличьими антителами (ЕА) [1]. Вычисляли процент клеток Нф или Мф, адсорбировавших на своей поверхности 3 и более эритроцитов (ЕА-РОК). Хемотаксис Нф определяли в опытах *in vivo* через 4 ч после внутрибрюшинного введения монокинов (50 мкл) интактным мышам, контрольным животным вводили физиологический раствор. В мазках из ПЭ, окрашенных по Романовскому–Гимзе, подсчитывали процент Нф, определяли общее число клеток в 1 мл ПЭ в камере Горяева, вычисляли абсолютное количество Нф в 1 мл ПЭ и определяли индекс активации Нф (ИАН) по формуле:

$$\text{ИАН} = (\text{Нфо} - \text{Нфк})/\text{Нфк},$$

где Нфо и Нфк – число Нф в опыте и контроле соответственно.

Для выявления способности лимфокинов вызывать РИМ, являющуюся моделью повышенной чувствительности замедленного типа *in vivo* [1], иммунизированным (на 3-и сут. после введения

30 мкг АГ1, АГ2 и АГ3) и интактным мышам вводили внутрибрюшинно 50 мкл лимфокинов (опытная группа) или физиологического раствора (контрольная группа) и через 4 ч у животных исследовали клеточный состав ПЭ. Определяли концентрацию клеток в камере Горяева и процент Мф в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе. Интенсивность реакции оценивали по индексу исчезновения макрофагов (ИИМ), который рассчитывали по формуле:

$$\text{ИИМ} = \text{ИМо} - \text{ИМк},$$

где ИМо и ИМк – показатели исчезновения Мф в опыте и контроле, вычислявшиеся по формулам:

$$\text{ИМо} = a_0 - v_0/a_0 \cdot 100 \text{ и } \text{ИМк} = a_k - v_k/a_k \cdot 100,$$

где a_0 и a_k – абсолютное число Мф в ПЭ примированных и интактных животных соответственно через 4 ч после введения физраствора, v_0 и v_k – абсолютное число Мф в ПЭ примированных и интактных животных через 4 ч после введения лимфокинов. Цитотоксическую активность ФНО-α в монокинах определяли на клетках мышинных фибробластов L-929. Активность ФНО-α выражали в количестве единиц активности, обратном титру разведения монокинов, обеспечивающему 50 %-ю гибель клеток L-929 в лунке (ЦТЕ-50). Протективные свойства антигенов изучали на беспородных белых мышах, которых двукратно иммунизировали 30 мкг антигенов в смеси с гидратом окиси алюминия (до конечной концентрации 1,2 мг/мл) с интервалом 10 сут., и на 21-е сут. после первичной иммунизации заражали 5 и 50 ЛД₅₀ умеренно вирулентного штамма *Burkholderia pseudomallei* 115. Определяли процент выживших животных и среднюю продолжительность жизни погибших (СПЖ). Статистический анализ результатов исследований осуществляли с определением средних величин и доверительных интервалов для уровня достоверности 95 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что ВСЭ *B.pseudomallei* 100 (АГ2) был наиболее протективным, он защищал 50 % животных от 5 ЛД₅₀ возбудителя мелиоидоза и существенно повышал СПЖ павших мышей от 5-50 ЛД₅₀. ВСЭ *B.pseudomallei* C-141 (АГ1) защищал 40 % животных от 5 ЛД₅₀ и также увеличивал СПЖ павших мышей от 5-50 ЛД₅₀. Наименьшие защитные свойства зарегистрированы у ВСЭ *B.thailandensis* 251 (АГ3): значимое увеличение СПЖ при заражении небольшой дозой возбудителя мелиоидоза – 5 ЛД₅₀. Выживаемость от 5 ЛД₅₀ составила всего 22 %. Все изученные препараты существенно не влияли на выживаемость мышей при заражении 50 ЛД₅₀.

Биологическая активность лимфокинов и монокинов, индуцированных антигенами буркхольдерий

| Индукторы | Лимфокины | | | Монокины | | |
|------------------------------------|--|--------|---|------------|---|-------------------------------|
| | Функции макрофагов | | | нейтрофилы | нейтрофилы | L-929 |
| | EA-РОК, % | ИИМ, % | КС | ИАН | EA-РОК, % | ФНО- α (ед. актив.) |
| BCЭ <i>B.pseudomallei</i> C-141 | 39 \pm 2,8 Контроль 32 \pm 1,8 | 8,0 | 4,13 \pm 0,8* Контроль 1,33 \pm 0,4 | 2,92 | 58 \pm 1,4* Контроль 28 \pm 0,6 | 32 |
| BCЭ <i>B.pseudomallei</i> 100 | 47 \pm 2,9 Контроль 32 \pm 1,8 | 13,8 | 4,94 \pm 0,9* Контроль 1,33 \pm 0,4 | 3,23 | 62 \pm 2,2* Контроль 28 \pm 0,6 | 128 |
| BCЭ <i>B.thailandensis</i> 251 | 49 \pm 3,6 Контроль 32 \pm 1,8 | 11,1 | 3,34 \pm 0,6 Контроль 1,33 \pm 0,4 | 2,73 | 34 \pm 2,1 Контроль 28 \pm 0,6 | 16 |

* – различия с контролем статистически достоверны ($p < 0,05$).

Анализируя результаты исследований влияния монокинов и лимфокинов на количество FcR на поверхности фагоцитов, следует отметить, что все изученные препараты не вызывали индукции лимфокинов, регулирующих экспрессию FcR на Мф (см. табл.). Вместе с тем монокины, индуцированные АГ1 и АГ2, усиливали ее на поверхности Нф: отмечено возрастание процента EA-РОК по сравнению с контролем. Активность монокинов, индуцированных АГ3, была значительно ниже и существенно не отличалась от контрольных цифр. Изучение способности монокинов оказывать регуляторное воздействие на хемотаксис Нф показало, что АГ1 в качестве индуктора не отличается от АГ3. Более выраженной хемотаксической активностью обладали цитокины Мф, стимулированных АГ2. Изучение цитотоксичности ФНО- α в супернатантах лимфоцитов, стимулированных антигенами буркхольдерий, на клетках L-929 показало, что в лимфокинах, индуцированных АГ2, активность ФНО- α была максимальной. При изучении регуляторного влияния лимфокинов на фагоцитарную активность Мф установлено, что цитокины, стимулированные АГ2, в наибольшей степени повышали фагоцитарную активность Мф. Лимфоциты, стимулированные АГ1, также продуцировали цитокины, существенно стимулировавшие фагоцитоз Мф. Наименьшей активностью обладали лимфокины, индуцированные АГ3. Оценка влияния лимфокинов на содержание Мф в ПЭ показала, что введение лимфокинов, стимулированных всеми тремя антигенными комплексами, иммунизированным мышам сопровождалась РИМ, уровень которой был невысоким.

Анализ полученного экспериментального материала позволяет констатировать взаимосвязь между цитокин-индуцирующей активностью

антигенных комплексов буркхольдерий и их протективными свойствами. Установлена зависимость между уровнем активности лимфокинов, модулирующих фагоцитарную способность Мф, и степенью протективности антигена – индуктора лимфокинов. Отмечена прямая взаимосвязь между степенью экспрессии Fc-рецепторов на поверхности Нф под влиянием монокинов и защитными свойствами антигена-индуктора. Выявлена взаимосвязь между активностью ФНО- α монокинов и защитными свойствами антигенов буркхольдерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, защитные свойства антигенов буркхольдерий зависят от их способности индуцировать выработку цитокинов, стимулирующих клеточное звено иммунитета. Полученные нами данные вполне согласуются с известным положением о доминирующей роли клеточных факторов иммунитета в защите от мелиоидозной инфекции [5] и могут быть использованы при конструировании мелиоидозной вакцины в качестве дополнительных критериев отбора протективных антигенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева Г.И., Иванова И.А., Беспалова И.А. и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2002. – № 3. – С. 39–45.
2. Любимов Г.Ю., Зенков Н.К., Вольский Н.Н. и др. // Иммунология. – 1992. – № 1. – С. 40–43.
3. Barnes J.L., Ulett G.C., Rethesan N., et al. // Immunol. Cell Biol. – 2001. – Vol. 79. – P. 490–501.
4. Simpson A.J., Smith M.D., Weverling G.Y., et al. // J. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 181(2). – P. 621–625.
5. Stephens D.P., Fisher D.A., Currie B.J. // Intern. Med. J. – 2002. – Vol. 32. – № 4. – P. 143–148.