

Проф. В.Ф. Кузнецов, асс. О.М. Бухарин, ст.н.с. И.А. Домский
Взаимодействие *in vitro* крови и сверхмалых количеств
бактериального антигена при вирусной инфекции норок

Кировский медицинский институт
ВНИИ охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б.М. Житкова
КНИИ гематологии и переливания крови

Ранее нами при экспериментальной вирусной инфекции (чуме плотоядных) у норок выявлен феномен активации фагоцитов, проявляющийся в виде неспецифического усиления поглотительной активности нейтрофилов в отношении бактериальных субстанций раз-личной антигенной специфичности (Кузнецов В.Ф., Бухарин О.М., Домский И.А., 1998).

В патогенезе данного явления общеизвестно значение микробного фактора, цитокинов различного происхождения, веществ, образующихся при активации ряда систем (комплемент, калликреин-кининовая система) и процессов (метаболизм арахидоновой кислоты, распад тканей) (Маянский А.Н., Маянский Д.Н., 1989). Фактором, усиливающим поглотительную активность нейтрофилов, может быть и адгезия нейтрофилов на клеточной поверхности, на которой происходит фагоцитарный процесс (Klebanoff S.J., Clark R.A., 1978; Кузнецов В.Ф., 1995).

Активированные нейтрофилы характеризуются не только усилением поглотительной активности, но и стимуляцией других проявлений их реактивности. Так, происходит увеличение их адгезивности, способности к хемотаксису, бактерицидности, способности экспрессировать на мемbrane адгезионные молекулы, синтезировать и отвечать на цитокины (Маянский А.Н., Маянский Д.Н., 1989; Hartshorn K.L., Liou L.S., White M.R. et al., 1995; и др.). Однако не изучены формы реакции нейтрофилов на сверхмалые количества антигена *in vitro* у животных при экспериментальной вирусной инфекции. Это и явилось целью настоящего исследования.

Материалы и методы. Норкам стандартного окраса в 7-месячном возрасте

внутримышечно вводили 1000 ЛД₅₀/мл вирулентного штамма вируса чумы плотоядных "Sneider Hill" (Кузнецов В.Ф., Домский И.А., Бухарин О.М. и др., 1997). На 13 день (клинические проявления болезни) после заражения брали кровь (из хвоста). В качестве антикоагуланта использовали гепарин (50 Ед/мл).

Для исследования влияния сверхмалых количеств антигена на нейтрофилы цельную кровь в соотношении 1:1 смешивали в одноразовых пробирках с антигеном Буавена шигелл Флекснера или кишечных иерсиний (концентрация составила 0,05 фг/мл). Инкубировали 30 мин при 37 °С. Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН) производили в условиях периодического перемешивания крови и объектов фагоцитоза (ОФ) (Кузнецов В.Ф., Каплин В.Н., Обернебесова Т.П., 1995). Кровь и равное количество взвеси ОФ, инкубировали 5-10 мин при 37 °С. На предметное стекло переносили 10 мкл смеси, готовили мазок, высушивали, фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому.

В качестве объектов фагоцитоза использовали эритроцитарный антигенный диагностикum (ЭД) Флекснера и кишечных иерсиний для реакции непрямой гемагглютинации (СПБНИИВС). Для приготовления взвеси ОФ ампулу ЭД разводили в 10 мл среды 199 или раствора Хенкса, дважды отмывали центрифугированием 3-5 мин при 3000 об/мин. Центрифугат разводили в 1 мл среды. Взвесь отстаивали в течение 20 мин для удаления конгломератов ОФ, отделяли 0,7 мл надосадочной жидкости и доводили в ней концентрацию до 10⁵ ОФ в 1 мкл.

Определяли фагоцитарное число (ФЧ)-среднее количество ОФ, приходящееся на 1

из 100 учтенных нейтрофилов, процент фагоцитоза (%Ф)- % нейтрофилов, поглотивших ОФ, и фагоцитарный индекс (ФИ)- среднее количество ОФ, приходящееся на 1 фагоцитирующую нейтрофил. Наряду с этими общепринятыми показателями оценивали популяционный состав нейтрофилов по их функциональной активности. Так, учитывали % "нулевых" нейтрофилов (% 0-нф), которые не содержат ОФ, % малоактивных нейтрофилов (% ма-нф), которые содержат 1 ОФ, % активных нейтрофилов (%а-нф), которые содержат 2 и более ОФ, наконец определяли ФИ а-нф.

Статистическую значимость выявленных сдвигов оценивали с помощью критерия Стьюдента (t), а также критерия Вилкоксона-Манна-Уитни (U) (Плохинский Н.А., 1970; Гублер Е.В., 1978).

Авторы приносят благодарность сотрудникам кафедры патологической физиологии Кировского медицинского института М.В.Милютину и И.С.Бякову, оказавшим помощь в постановке лабораторных тестов и взятии крови у животных.

Результаты исследований и обсуждение. В ходе эксперимента установлены различные особенности воздействия сверхмалых количеств бактериального антигена в зависимости от их антигенной специфичности на фагоцитарную активность нейтрофилов (см. табл. 1 и табл. 2).

При инкубации сверхмалых количеств антигена шигелл Флекснера (0,05 фг/мл) с кровью норок, взятой на 13-й день чумы плотоядных, выявлено ряд достоверных сдвигов поглотительной активности нейтрофилов к ОФ шигелл Флекснера (табл. 1). Так, на 10-й мин фагоцитарного процесса количество ма-нф увеличилось. В этот же временной интервал удельная поглотительная активность а-нф в отношении ОФ шигелл Флекснера была сниженной ($P < 0,01$).

В качестве контроля специфичности реакции, формирующейся на сверхмалые количества антигена шигелл Флекснера, использовали ОФ кишечных иерсиний, в отношении которых также отмечены

достоверные сдвиги фагоцитарных показателей. Так, увеличивается количество нейтрофилов, вовлеченных в фагоцитарный процесс (%Ф), возрастает фагоцитарное число (ФЧ), а также количество высокоактивных нейтрофилов (% а-нф) и их удельный поглотительный потенциал (ФИ а-нф).

Таким образом, под влиянием сверхмалых количеств антигена Флекснера специфически увеличивается количество малоактивных нейтрофилов, но снижается потенциал высокоактивных микрофагов. Параллельно отмечается усиление поглотительной активности высокоактивных нейтрофилов к объектам фагоцитоза иерсиний. Приведенные материалы свидетельствуют о разнонаправленных сдвигах фагоцитарного процесса под влиянием сверхмалых количеств антигена Флекснера *in vitro* при экспериментальной вирусной инфекции.

При инкубации крови с антигеном кишечных иерсиний (0,05 фг/мл), взятой на 13-й день инфекции норок, поглотительная активность в отношении объектов фагоцитоза иерсиний не изменилась (табл. 2). Фагоцитарная активность к ОФ шигелл, использованных в данной ситуации в качестве контроля специфичности, возрас-тала, что проявляется в виде увеличения количества малоактивных нейтрофилов (% ма-нф, 10 мин).

Таким образом, под влиянием сверхмалых количеств антигена иерсиний отмечается увеличение фагоцитоза, имеющее неспецифический характер.

Представленные материалы получены при исследовании фагоцитарной активности нейтрофилов в суспензии клеток при их периодическом перемешивании. Одновре-менно Обыла изучена фагоцитарная активность нейтрофилов при их распо-ложении на поверхности аутологичных клеток крови, состоящих преимущественно из эритроцитов. В этих условиях сдвигов фагоцитоза под влиянием сверхмалых количеств бактериальных антигенов не установлено (эти материалы не приводятся).

Вероятность формирования сдвигов функциональной активности клеток крови

при воздействии бактериального антигена взятого в концентрации 10^{-15} - 10^{-19} г/мл (фемто- и аттограммы) установлена нами ранее. Так, с помощью столь малых количеств бактериальных липополисахаридов содержащих препаратов возможна индукция *in vitro* снижения стимулированного NBT-теста в фагоцитах цельной крови, а также изменение активности систем эритроцита, ответственных за баланс Na^+ и K^+ (Кузнецов В.Ф., 1993; 1994). Очевидно, что эффекты столь малых концентраций антигена не могут реализоваться через его прямое воздействие на реагирующие клетки, поскольку в субстрате, индуцирующем реактивные изменения клеток крови, отсутствуют

антигенные молекулы. Вероятно, в данной ситуации мы наблюдаем эффекты жидкости, в которой растворяли микробные субстанции и которая, вероятно, содержит "отпечатки", "копии" антигена. Последние вступают во взаимодействие с мембранным рецепторным аппаратом фагоцитов, детерминируя изменение их функциональной активности (Кузнецов В.Ф., 1993; 1994; 1995). Представленные материалы открывают свет не только на еще одно свойство активированных нейтрофилов, но и, на наш взгляд, позволяют исследовать начальные этапы реагирования нейтрофилов на бактериальную суперинфекцию в условиях смертельного вирусного заболевания.

Таблица 1

ФАН ($M \pm m$) при взаимодействии *in vitro* 0,05 фг/мл антигена шигел Флекснера и крови норок (в числителе - исходный фон, в знаменателе - 0,05 фг/мл антигена шигелл Флекснера)

| Вид исследуемого показат. | N | Вид объектов фагоцитоза | | | |
|---------------------------|---|-------------------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| | | Флекснера | | Иерсинии | |
| | | Инкубация с ОФ 5 мин. | Инкубация с ОФ 10 мин. | Иерсинии | Иерсинии |
| % Ф | 6 | <u>15,3± 4,14</u> | <u>14,7± 3,23</u> | <u>45,2± 4,83</u> | <u>24,7± 3,98</u> |
| | 6 | <u>18,0± 2,58</u> | <u>28,7± 4,42*</u> | <u>51,8± 3,50</u> | <u>19,0± 2,92</u> |
| ФЧ | 6 | <u>0,24± 0,06</u> | <u>0,17± 0,03</u> | <u>0,78± 0,10</u> | <u>0,32± 0,05</u> |
| | 6 | <u>0,28± 0,06</u> | <u>0,40± 0,06**</u> | <u>0,77± 0,07</u> | <u>0,24± 0,05</u> |
| ФИ | 6 | <u>1,57± 0,16</u> | <u>1,23± 0,19</u> | <u>1,69± 0,06</u> | <u>1,25± 0,06</u> |
| | 6 | <u>1,49± 0,24</u> | <u>1,39± 0,09</u> | <u>1,48± 0,10</u> | <u>1,23± 0,14</u> |
| % ма-нф | 6 | <u>8,67± 3,02</u> | <u>13,2± 3,46</u> | <u>21,7± 1,80</u> | <u>18,3± 2,67</u> |
| | 6 | <u>10,7± 3,04</u> | <u>19,8± 3,94</u> | <u>30,0 ± 3,54*</u> | <u>15,3± 2,25</u> |
| % а- нф | 6 | <u>6,67± 2,11</u> | <u>1,50± 0,96</u> | <u>23,5± 4,15</u> | <u>6,33± 1,56</u> |
| | 6 | <u>7,33± 3,38</u> | <u>8,83± 1,62**</u> | <u>21,8± 3,52</u> | <u>3,67± 2,03</u> |
| % 0-нф | 6 | <u>84,7± 4,14</u> | <u>85,3± 3,23</u> | <u>54,8± 4,83</u> | <u>75,3± 3,98</u> |
| | 6 | <u>82,0± 2,58</u> | <u>71,3± 4,42*</u> | <u>48,2± 3,5</u> | <u>81,0± 2,92</u> |
| ФИ а-нф | 6 | <u>1,83± 0,37</u> | <u>0,83± 0,54</u> | <u>2,38 ± 0,03</u> | <u>1,77± 0,37</u> |
| | 6 | <u>1,54± 0,49</u> | <u>2,18± 0,08**</u> | <u>2,13± 0,05**</u> | <u>1,17± 0,53</u> |

Примечание: *) и **) - $P<0,05$ и $0,01$ соответственно (к показателям исходного фона)

Таблица 2

ФАН ($M \pm m$) при взаимодействии *in vitro* 0.05 фг/мл антигена иерсиний и крови норок (в числителе - исходный фон, в знаменателе - 0,05 фг/мл антигена иерсиний)

| Вид исслед. показат. | N | Вид объектов фагоцитоза | | | |
|----------------------|---|-------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|
| | | Флекснера | Иерсинии | Флекснера | Иерсинии |
| | | Инкубация с ОФ 5 мин. | | Инкубация с ОФ 10 мин. | |
| % Ф | 6 | <u>14,7± 3,23</u> | <u>39,2± 5,96</u> | <u>24,7± 3,98</u> | <u>45,2± 4,83</u> |
| | 6 | 21,3± 4,7 | 36,8± 3,52 | 24,5± 4,10 | 42,0± 4,26 |
| ФЧ | 6 | <u>0,17± 0,03</u> | <u>0,54± 0,09</u> | <u>0,32± 0,05</u> | <u>0,78± 0,10</u> |
| | 6 | 0,27± 0,06 | 0,52± 0,07 | 0,32± 0,06 | 0,63± 0,1 |
| ФИ | 6 | <u>1,23± 0,19</u> | <u>1,36± 0,09</u> | <u>1,25± 0,06</u> | <u>1,69± 0,06</u> |
| | 6 | 1,22± 0,10 | 1,39± 0,09 | 1,30± 0,10 | 1,46± 0,09 |
| % ма-нф | 6 | <u>13,2± 3,46</u> | <u>29,0± 4,80</u> | <u>18,3± 2,67</u> | <u>21,7± 1,80</u> |
| | 6 | 16,7± 4,20 | 25,2± 2,30 | 18,7± 3,20 | 26,7± 0,80* |
| % а- нф | 6 | <u>1,50± 0,96</u> | <u>10,2± 2,52</u> | <u>6,33± 1,56</u> | <u>23,5± 4,15</u> |
| | 6 | 4,67± 2,30 | 11,7± 2,84 | 5,83± 2,18 | 15,3± 4,45 |
| % 0-нф | 6 | <u>85,3± 3,23</u> | <u>60,8± 5,96</u> | <u>75,3± 3,98</u> | <u>54,8± 4,83</u> |
| | 6 | 78,7± 4,70 | 63,2± 3,52 | 73,8± 3,91 | 49,5± 9,86 |
| ФИ а-нф | 6 | <u>0,83± 0,54</u> | <u>1,97± 0,40</u> | <u>1,77± 0,37</u> | <u>2,38± 0,03</u> |
| | 6 | 1,40± 0,45 | 2,23± 0,07 | 1,70± 0,41 | 2,39± 0,13 |

Примечание: *) и **) - $P<0,05$ и 0,01 соответственно (к показателям исходного фона)

Литература.

- Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. - Л., 1978. - 294 с.
- Кузнецов В.Ф. Патофизиология реактивности нейтрофила в системе клеточно-гуморальных взаимодействий. - Дисс. ... докт. мед. наук. - Киров. - 1995.- 435 с.
- Кузнецов В.Ф. Влияние сверхмалых доз липополисахаридного антигена на интенсивность НСТ-теста в цельной крови // Тез. докл. 1 Съезда иммунологов России. Новосибирск, 23-25 июня 1992. - Новосибирск, 1992 6.- 0 6С 0. 259.
- Кузнецов В.Ф. Феномен сопряжения рецепторов для бактериальных агентов с транспортными системами для натрия и калия в эритроцитах человека // 0 Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины (Материалы научной конференции 2-3 марта 1993 г). - Киров, 1993. - С. 27-28.
- Кузнецов В.Ф. 0 Феномен взаимодействия сверхмалых количеств микробных агентов с фагоцитами и эритроцитами крови здоровых доноров // Успехи физиологических наук.- 01994 - Т. 25, N 3.- С. 65.
- Кузнецов В.Ф., Каплин В.Н., Обернебесова Т.П. Методические сноски применения эритроцитарных диагностикумов в качестве объектов фагоцитоза // Клиническая лабораторная диагностика. - 1995, N5. - С. 21-23.
- Кузнецов В.Ф., Домский И.А., Бухарин О.М. и др. Изменение показателей крови у

норок при экспериментальной чуме плотоядных // Ветеринария.- 1997, N1.- С.24-26

8. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.- Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1989.- 344 с.

9. Плохинский Н.А. Биометрия.- М., Издательство Московского университета. 1970.- 367 с.

10. Феннер Ф., Мак-Ослен Б., Мимс С. и др. Биология вирусов животных. - М., 1977.- Т. 1. - 447 с.

11. Hartshorn K.L., Liou L.S., White M.R., Kazhdan M.M., Tauber J.L., Tauber A.I. Neutrophil deactivation by influenza

A virus. Role of hemagglutinin binding to specific sialic acid-bearing cellular proteins // J. Immunol.- 1995.- V. 154.- P.3952-3960.

12. Klebanoff S.J., Clark R.A. The neutrophil: function and clinical disorders.- North Holland, Amsterdam, 1978.- 810 p.

INTERACTIONS OF THE BLOOD AND TINY QUANTITIES OF BACTERIAL ANTIGEN IN VITRO IN VIRAL INFECTION OF MINKS

V. F. Kuznetsov, M.D., Professor of Pathophysiology, O. M. Bukharin, M.D., Assistant Professor of Anatomy, I. A. Domsky, Deputy Head for Research of Kirov Research Institute of Hunting and Animal Feeding, Senior Research Associate, Kirov, Russia

In experimental paramyxoviral infection in minks the number of low activity neutrophils specific increases, and the potential of high activity neutrophils specific decreases. These processes result from interactions of the experimental animals blood and tiny quantities of antigen of *Shigella flexneri* in vitro. Simultaneously increase of phagocytic activity of high activity neutrophils to *Yersinia* phagocytosis objects was revealed. The results of the study show diverse direction changes of the phagocytic process to *Shigella* and *Yersinia* under the influence of tiny quantities of *Shigella flexneri* antigens in vitro in experimental viral infection.