

Проф. В.Ф. Кузнецов, асс. О.М. Бухарин, ст.н.с. И.А. Домский

Феномен активации нейтрофилов при экспериментальной парамиксовирусной инфекции

Кафедра патологической физиологии КГМИ

ВНИИ охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б.М. Житкова

КНИИ гематологии и переливания крови

Известно, что чума плотоядных представляет интерес не только для ветеринарных, но и медицинских работников, так как возбудитель данного заболевания, относящийся к парамиксовирусам, имеет антигенные и генетическое родство с вирусом кори [Феннер Ф. и др., 1977], а данную парамиксовирусную инфекцию можно рассматривать как экспериментальную модель кори человека [Nagata T. et al., 1990].

Ранее при экспериментальной чуме плотоядных у норок выявлена анемия, которая носит преимущественно гемолитический характер [Кузнецов В.Ф. и соавт., 1997]. Выраженность анемии коррелирует с проявлениями клинической симптоматики данной инфекции, а одним из факторов ее патогенеза является активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) в цельной крови.

При ряде вирусных инфекций [Hartshorn K.L. et. al., 1995] формируется снижение функционального потенциала нейтрофилов. Известно [Klebanoff S.J., Clark R.A., 1978; Кузнецов В.Ф., 1995], что *in vivo* фагоцитоз наиболее оптимально происходит при адгезии нейтрофилов на поверхности аутологичных клеток, которые могут выполнять в фагоцитарном процессе модулирующую роль.

В этой связи актуальным является изучение фагоцитоза на поверхности аутологичных клеток и в ихзвеси в динамике нарастания анемии при экспериментальной чуме плотоядных.

Материалы и методы. Норок стандартного окраса в возрасте 7 месяцев экспериментально заражали вирулентным штаммом вируса чумы плотоядных "Sneider Hill". Методика заражения описана нами ранее [Кузнецов В.Ф., Домский И.А., Бухарин О.М. и др., 1997]. Исследование осуществляли до заражения, а

также на 5 день (в инкубационный период) и на 13 день (клинические проявления болезни) инфекции.

В качестве объектов фагоцитоза (ОФ) использовали эритроцитарный антигенный диагностикum (ЭД) из шигелл Зонне, Флекснера и кишечных иерсиний для реакции непрямой гемагглютинации (СПБНИИВС) [Кузнецов В.Ф., Каплин В.Н., Обернебесова Т.П., 1995].

Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН) производили в двух вариантах [Кузнецов В.Ф., Давидов М.И., Обернебесова Т.П., 1995]. В первом варианте исследования (ФАН₁) определяли поглотительную активность нейтрофилов, расположенных на поверхности седиментированных аутологичных клеток крови. Во втором - фагоцитоз исследовали во взвеси клеток крови в условиях периодического перемешивания крови и ОФ (ФАН₂).

Определяли фагоцитарное число (ФЧ)- среднее количество ОФ, приходящееся на 1 из 100 учтенных нейтрофилов, а также процент фагоцитоза (%Ф)- % нейтрофилов, поглотивших ОФ, и фагоцитарный индекс (ФИ)- среднее количество ОФ, приходящееся на 1 фагоцитирующий нейтрофил, а также показатель объемного фагоцитоза, отражающий количество объектов фагоцитоза, поглощенными нейтрофилами, содержащимися в одном микролитре крови (Об.Ф.).

Продукты перекисного окисления липидов в цельной крови исследовали в гептан-изопропанольных экстрактах цельной крови [Волчегорский И.А. и соавт., 1989]. В верхнем (гептановом) слое с помощью спектрофотометра СФ-46 при длине волны 220, 232, 278 нм определяли экстинции

соответственно ненасыщенных липидов, диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов. Данный биофизический тест давал интегральную характеристику уровней продуктов ПОЛ, которые отражают интенсивность процессов повреждения биологических структур [Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., 1972].

Статистическую значимость выявленных сдвигов оценивали с помощью критерия Стьюдента, коэффициента корреляции (R), метода простой регрессии (F), 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 помошь в постановке лабораторных тестов и взятии крови у животных.

Результаты исследований и обсуждение. В ходе эксперимента установлено нарастание фагоцитарной активности нейтрофилов при экспериментальной вирусной инфекции. Следует отметить, что феномен активации нейтрофилов установлен в обоих тестах исследования фагоцитоза, использованных нами.

Так, при использовании теста, обозначенного нами ФАН₁, достоверное увеличение фагоцитарной активности нейтрофилов в отношении объектов шигелл Зонне отмечено уже на пятый день инфекции (инкубационный период). На 13-е сутки, когда отмечали проявление клинических признаков болезни, наблюдали достоверное увеличение фагоцитоза не только в отношении шигелл Зонне (увеличение показателя объемного фагоцитоза), но и кишечных иерсиний (увеличение всех использованных показателей), и шигелл Флекснера (увеличение показателя объемного фагоцитоза и количества нейтрофилов, вовлеченных в фагоцитоз).

В ФАН₂ при инфекционном процессе установлены сдвиги, имеющие ту же направленность, что и в ФАН₁. Так, уже на 5 день заболевания (инкубационный период) отмечают достоверное увеличение показателя

объемного фагоцитоза, количества нейтрофилов, вовлеченных в фагоцитарный процесс (%Ф), а также фагоцитарного числа. Феномен неспецифической активации поглотительной активности нейтрофилов выявлен и на 13 день инфекционного процесса.

Приведенные материалы позволяют заключить, что при экспериментальной вирусной инфекции, возникающей после введения животным смертельной дозы возбудителя чумы плотоядных, отмечается феномен активации нейтрофилов. Эта закономерность выявляется уже в инкубационный период и имеет неспецифический характер.

Общеизвестно, что активация поглотительной активности нейтрофилов возникает при воздействии цитокинов различного происхождения, продуктов активации метаболизма арахидоновой кислоты и системы комплемента, компонентов калликреин-кининовой системы, микробных агентов. Фактором, усиливающим поглотительную активность нейтрофилов может быть и адгезия микрофагов на клеточной поверхности, на которой происходит фагоцитарный процесс [Klebanoff S.J., Clark R.A., 1978; Маянский А.Н., Маянский Д.Н., 1989; Кузнецов В.Ф., 1995].

Нами сделана попытка исследования механизма увеличения фагоцитоза при экспериментальной вирусной инфекции в двух приведенных выше моделях взаимодействия нейтрофилов и ОФ *in vitro*. Установлено, что на 5 и 13 дни инфекционного процесса выявлены достоверные позитивные корреляционные связи количества продуктов ПОЛ в цельной крови и величин поглотительной активности нейтрофилов в ФАН₁.

Описанных выше корреляционных взаимосвязей не установлено при определении поглотительной активности нейтрофилов в ФАН₂. Приведенные закономерности свидетельствуют о том, что одним из патогенетических фактооров формирования активации "поверхностного" фагоцитоза при вирусной инфекции является

позитивное воздействие продуктов ПОЛ.

Представленные методические подходы можно использовать как дополнительные тесты анализа патологической реактивности организма при чуме плотоядных у норок. Можно предположить, что течение парамиксовирусной инфекции у людей сопровождается аналогичными процессами.

Литература

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М., 1972.- 232 с.
2. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лицшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопросы мед. химии. - 1989.- Т. 35, N 1.- С. 127- 131.
3. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. - Л. , 1978. - 294 с.
4. Кузнецов В.Ф. Патофизиология реактивности нейтрофила в системе клеточно-гуморальных взаимодействий. - Дисс. ... докт. мед. наук. - Киров. - 1995.- 435 с.
5. Кузнецов В.Ф., Давидов М.И., Обернебесова Т.П. Фагоцитарный тест в оценке антимикробной защиты при воспалительных урологических заболеваниях // Урология и нефрология.- 1995, N1. - С.16-18.
6. Кузнецов В.Ф., Каплин В.Н., Обернебесова Т.П. Методические основы применения эритроцитарных диагностикумов в качестве объектов фагоцитоза // Клиническая лабораторная диагностика. - 1995, N5. - С. 21-23.
7. 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.
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.
13. Nagata T., Ochikubo F., Yoshikawa Y. et al. Encephalitis induced by a canine distemper virus in squirrel monkeys // J. Med. Primatol. - 1990. - Vol. 19, N 2 - P. 137-149.

ACTIVATION OF NEUTROPHILS IN EXPERIMENTAL PARAMYXOVIRAL INFECTION

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

The current study determined increase of phagocytic activity of neutrophils located on the surface of autologic erythrocytes (PAN1) and in suspension of blood cells (PAN2) in case of infection by canine distemper virus in minks. Different profiles of correlations of phagocytic tests and physical and chemical parameters were revealed. PAN1 correlates positively, and PAN2 does not correlate with lipid peroxidation products. These techniques and approaches may be used as additional tests for pathological reactivity of the organism in experimental paramyxoviral infection.