

Влияние иммуномодуляторов на реактивность клеток иммунной системы при моделировании противотуляремийного вакцинного процесса

А.Л. Кравцов (rusrapi@microbe.ru), С.Н. Ключева, С.А. Бугоркова

ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

Резюме

Исследовали влияние азоксимера бромида (полиоксидония – ПО) и даларгина (ДА) на реактивность клеток иммунной системы при моделировании противотуляремийного вакцинного процесса у мышей линии Balb/c. Животных иммунизировали подкожно дозой 10^4 живых микробных клеток штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. ПО или ДА вводили подкожно за 60 мин до вакцинации соответственно в дозах 4 и 2 мкг. На 3-е и 21-е сутки иммуногенеза исследовали периферические органы иммунной системы и содержимое брюшной полости. Клеточную реакцию на вакцинацию и исследуемые иммуномодуляторы оценивали методом проточной цитометрии (CyAn ADP) по двум показателям светорассеяния, а также по изменению количества пролиферирующих клеток и клеток в апоптозе. Кроме того, для характеристики изменений функционального состояния ядер лимфоцитов применяли световую микроскопию и определяли титры специфических антител. Установлена различная реакция лимфоцитов и фагоцитов интактных мышей на введение ПО и ДА. В отличие от ПО, ДА стимулировал пролиферацию лимфоцитов и активировал апоптоз макрофагов, воздействуя на их цитоплазматические гранулы. Особенность эффекта ПО заключалась в способности активировать миграцию фагоцитов с высоким содержанием цитоплазматических гранул из брюшной полости мышей в селезенку. Только при использовании ПО в качестве иммуномодулятора при моделировании противотуляремийного вакцинного процесса регистрировали существенное повышение титров специфических антител на фоне более длительной функциональной активации спленоцитов и пониженной интенсивности повреждения макрофагов в селезенке и брюшной полости.

Ключевые слова: вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, полиоксидоний, даларгин, проточная цитометрия, апоптоз, пролиферация, ядрышковый организатор (AgNOR), антитела

The impact of Immunomodulators on Reactivity the Immune System Cells in Model Vaccinal Process against Tularemia

A.L. Kravcov (rusrapi@microbe.ru), S.N. Klyueva, S.A. Bugorkova

Federal State Institution of Public Health «Russian Scientific Research Institute «Microbe»

Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Saratov

Abstract

Investigated is the effect of azoximer bromide (polioxidonium – PO) and dalargin (DA) on the immune system cell reactivity in the anti-tularemia vaccine process modeling in Balb/c mice. The animals were immunized subcutaneously with a dose of 10^4 live microbial cells of vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG. PO or DA subcutaneously administered 60 min before vaccination, respectively, in doses of 4 mg and 2 mg. On 3rd and 21st days of immunogenesis the peripheral organs of the immune system and the contents of the abdominal cavity were investigated. Cell response to vaccination and investigated immunomodulators evaluated by flow cytometry (CyAn ADP) for two light scatter parameters and for changing the proliferating and apoptotic cell number. Additionally, for the characterization of changes in the functional status of lymphocytes nuclei the light microscopy was used and titers of specific antibodies were determined. Installed is the different response of intact mice lymphocytes and phagocytes to PO and DA introduction. As distinct from PO, DA stimulated the lymphocyte proliferation and macrophage apoptosis by acting on their cytoplasmic granules. PO activated the migration of phagocytes with high cytoplasmic granules from mice abdominal cavity in the spleen. Only when using the PO as an immunomodulator in anti-tularemia vaccine process modeling recorded a significant increase in specific antibody titers against the background of a long-term functional splenocyte activation and macrophages reduced macrophage damage intensity in the spleen and abdomen.

Key words: vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG, polyoxidonium, dalargin, flow cytometry, apoptosis, proliferation, nucleolar organizer (AgNOR), antibodies

Введение

Главным достоинством вакцины туляремийной живой сухой, применяемой в России для специфической профилактики туляремии и представляющей собой лиофилизированную культуру живых микробов вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ, является ее высокая иммуноген-

ность. Сохранение остаточной вирулентности у вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ обеспечивает его приживаемость и размножение в макроорганизме, а, следовательно, способствует развитию у привитых активного противотуляремийного иммунитета [1]. Но как любая живая вакцина она обладает определенной реактогенностью, для сни-

жения которой одним из актуальных направлений считается поиск средств, способных снижать проявления остаточной вирулентности живых вакцин и потенцировать реакции клеточного иммунитета иммуногенных препаратов.

В последние годы отмечается повышенный интерес исследователей к применению для этой цели иммуномодуляторов, действие которых избирательно направлено на активацию и регуляцию функций клеток врожденного иммунитета – фагоцитов [2 – 4]. Именно с активацией определенного набора рецепторов на поверхности клеток фагоцитов связан тип развития адаптивного иммунного ответа, регулируемого Т-лимфоцитами (Th1, Th2, Th17, Treg) [5]. Фагоциты участвуют в регуляции пролиферации лимфоцитов и экспрессии рецепторов на их поверхности, контролируют активность продуцируемых лимфоцитами цитокинов и тем самым влияют на интенсивность адаптивного иммунного ответа, стимулируя процесс антителообразования [6, 7].

К иммуномодуляторам, воздействующим на рецепторы и функциональную активность клеток врожденного иммунитета, относится полиоксидоний (ПО) [8]. Кроме того, по литературным данным, он стимулирует пролиферацию лимфоцитов и усиливает продукцию специфических антител при противочумной вакцинации [2, 4]. Известно также о воздействии на функционально-метаболическую активность фагоцитов даларгина (ДА), являющегося регуляторным пептидом, синтетическим аналогом лейэнкефалина. Связываясь с клеточными рецепторами, ДА изменяет баланс Th1/Th2-клеток в организме [9] и, в частности, влияет на продукцию цитокинов лейкоцитами крови привитых против чумы людей [3].

Остаточная вирулентность культур вакцинного штамма туляремиального микроба, определяемая в соответствии с действующими нормативными документами в опытах на мышах [1], может проявляться патоморфологическими изменениями в органах и тканях животных, но возможно развитие повреждения лишь на уровне изменения функционального состояния клеток иммунной системы. К таким нарушениям можно отнести функциональные изменения, приводящие к апоптозу. Результатом массивной гибели макрофагов посредством индуцированного бактериями апоптоза является нарушение процесса удаления из организма хозяина апоптотических клеток. Это приводит к пост-апоптотическому аутолизису (вторичный некроз) макрофагов, нейтрофилов и других поврежденных клеток иммунной системы, к выбросу в кровь и ткани опасных аутологических молекул (DAMPs – damage-associated molecular patterns), играющих важную роль в развитии реакций системного воспаления при бактериальных инфекциях [10], в том числе и при туляремии [11].

Влияние вакцинного штамма 15 НИИЭГ туляремиального микроба на процессы апоптоза и про-

лиферации спленоцитов и макрофагов при моделировании противотуляремиального вакцинного процесса в настоящее время недостаточно исследовано и не изучалось в условиях направленной иммуномодуляции.

Цель данной работы – провести сравнительный анализ влияния иммуномодулятора азоксимера бромида (полиоксидоний) и синтетического аналога лейэнкефалина (даларгин) на реактивность клеток иммунной системы мышей линии Balb/c, иммунизированных культурой вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Материалы и методы

Мышей линии Balb/c массой 18 – 20 г подкожно иммунизировали *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 10^4 м.к. (2-я группа), а также в сочетании с ПО (3-я группа) или ДА (4-я группа). Части интактных мышей инокулировали соответственно только ПО (5-я группа) или ДА (6-я группа). Контрольную (1-ю группу) составили интактные мыши. Всего в работе было использовано 72 животных (по 12 особей в каждой группе).

Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученный из «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб», выращивали на FT агаре с глюкозо-витаминной добавкой (ФБУН «ГНЦ ПМБ») при температуре 37 °С в течение 48 ч. Взвеси живых микробных клеток готовили в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида pH 7,2 по стандартному образцу мутности ОСО-42-28-85П 10 единиц, эквивалентному $5 \cdot 10^8$ м.к./мл. Иммуномодуляторы (ПО фирмы ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия и ДА ФГУ «РКНПК», Россия) вводили животным подкожно за 60 мин до вакцинации соответственно в дозе 4 и 2 мкг.

На 3-и и 21-е сутки иммуногенеза мышей умерщвляли декапитацией, забирали кровь, селезенку, регионарные лимфатические узлы (РЛУ), содержимое брюшной полости после выполнения процедуры перитонеального лаважа. Лимфоциты из РЛУ и спленоциты (СП) выделяли общепринятыми методами. Макрофаги селезенки (МС) и перитонеальные макрофаги (ПМ) получали соответственно из суммарной фракции СП и перитонеальной жидкости методом адгезии на пластиковых чашках Петри после инкубации в течение 2 ч при 37 °С в CO_2 -инкубаторе [12].

Жизнеспособность макрофагов в момент их выделения оценивали в тесте с трипановым синим. В мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза, определяли в исследуемых клеточных взвесах относительное содержание лимфоцитов и фагоцитов, а также суммарную концентрацию лейкоцитов для оптимизации данного параметра (не более $5 \cdot 10^5$ клеток/мл) при проведении проточно-цитометрического анализа.

Методом проточной цитометрии исследовали характер распределений отдельных клеток по клеточному циклу для определения относительного со-

держания (в %) пролиферирующих и апоптотических клеток, несущих соответственно более 2С ДНК (стадии S+G2+М клеточного цикла) и менее 2С ДНК на клетку [13]. Для этого клетки фиксировали 70% этанолом, окрашивали раствором, содержащим 50 мкг/мл пропидия йодида (MP Biomedicals, LLC, Германия), 100 мкг/мл РНКазы (Thermo Scientific, Литва), 0,1 % Triton X-100 (MP Biomedicals, LLC, Германия) [14] и анализировали на проточном цитометре CyAn ADP. С помощью проточной цитометрии оценивали реактивность клеток иммунной системы в ответ на введение живых туляремийных микробов и исследуемых препаратов по таким важным параметрам как клеточный объем [15] и внутриклеточная гранулярность [16] путем измерения в потоке прямого (малоуглового) и бокового (под углом 90 градусов) светорассеяния.

Для визуального морфологического анализа клеток в лимфоидных органах гистологический материал фиксировали в 10% водном нейтральном растворе формалина, выполняя стандартный протокол для дальнейшей его обработки [17]. Аффинные к серебру белки в области ядрышкового организатора (AgNOR) выявляли в полутонких срезах лимфоидных органов [18] с использованием готового набора реактивов фирмы BioVitrum (Россия). Функциональное состояние ядерного аппарата лимфоцитов в каждом случае оценивали с помощью светового микроскопа OLYMPUS CX 41 при увеличении $\times 900$ и программы VideoZavr 1.5.

Анализировали состояние 300 ядер лимфоцитов и рассчитывали среднее содержание AgNOR-позитивных гранул на 1 ядро, определяя долю клеток с различным содержанием в ядре AgNOR-позитивных гранул (1, 2, 3 и более) [19]. Морфологические изменения в выделенных макрофагах оценивали при увеличении 40 на аппаратно-программном комплексе «Мекос-Ц», оснащенном микроскопом Olympus CX 31 с видеокамерой JVC. Работу проводили в программе «Денситоморфометрия» (версия 2.1.0.0.).

Титр сывороточных антител у вакцинированных против туляремии мышей Balb/c определяли в реакции агглютинации объемным методом согласно инструкции производителя туляремийного диагностикума (ФГУП «НВО «Микроген», Россия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2010 и «Statistica» 7.0. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как следует из таблицы 1, после введения интактным животным ПО или ДА (группы 5 и 6) не активировался апоптоз ПМ и СП, хотя ДА, в отличие от ПО, стимулировал пролиферацию СП (на 3-и сутки) и ПМ (в большей степени на 21-е, чем на 3-и сутки). В популяции МС на 3-и сутки ПО активировал пролиферацию, а на 21-е – апоптоз, в то время как ДА

Таблица 1.
Изменение показателей пролиферативной активности и апоптоза клеток иммунной системы мышей линии Balb/c, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ на фоне введения полиоксидония или даларгина

Группа животных	Срок после иммунизации (сутки)	Доля в суммарной клеточной популяции ($M \pm m$ %)					
		Спленоциты		Перитонеальные макрофаги		Макрофаги селезенки	
		пролиферация	апоптоз	пролиферация	апоптоз	пролиферация	апоптоз
1. Контроль	–	$8,6 \pm 0,5$	$3,9 \pm 0,15$	$1,7 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,3$	$14,7 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,6$
2. <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	3	$19,0 \pm 0,8^*$	$4,0 \pm 0,7$	$9,8 \pm 0,4^*$	$3,8 \pm 0,6$	$23,7 \pm 0,5^*$	$20,8 \pm 1,7^*$
	21	$6,6 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,7$	$18,6 \pm 0,4^*$	$22 \pm 0,4^*$	$7,6 \pm 0,6^*$	$24,9 \pm 2,4^*$
3. <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ + полиоксидоний	3	$26,1 \pm 1,0^{**}$	$2,7 \pm 0,6$	$6,0 \pm 0,7^*$	$2,2 \pm 0,2$	$18,3 \pm 0,5^*$	$15,3 \pm 1,3$
	21	$11,6 \pm 1,1^{**}$	$2,8 \pm 0,6$	$13,6 \pm 0,4^*$	$1,2 \pm 0,1^{**}$	$15,2 \pm 0,4^{**}$	$18,6 \pm 0,3^*$
4. <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ + даларгин	3	$9,3 \pm 1,1^{**}$	$13,4 \pm 0,5^{**}$	$8,6 \pm 0,6^*$	$0,9 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,7^{**}$	$30,8 \pm 1,4^{**}$
	21	$10,7 \pm 0,9$	$8,9 \pm 0,7^{**}$	$8,8 \pm 0,3^{**}$	$0,6 \pm 0,05^{**}$	$9,8 \pm 0,8^*$	$33,3 \pm 1,3^*$
5. Полиоксидоний	3	$9,7 \pm 1,6$	$4,2 \pm 0,4$	$4,5 \pm 2,5$	$1,4 \pm 0,3$	$23,9 \pm 0,01^*$	$17,2 \pm 3,5$
	21	$5,8 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,05^{**}$	$1,06 \pm 0,02^{**}$	$12,3 \pm 0,3$	$21,2 \pm 0,7^*$
6. Даларгин	3	$17,3 \pm 0,4^*$	$6,6 \pm 0,3$	$7,9 \pm 0,5^*$	$1,4 \pm 0,1$	$10,7 \pm 0,8^{**}$	$28,6 \pm 1,7^*$
	21	$10,7 \pm 0,1$	$6,6 \pm 0,4^{**}$	$13,0 \pm 0,03^*$	$1,8 \pm 0,5^{**}$	$19,0 \pm 0,1^{**}$	$24,2 \pm 0,2^*$

Примечание: *достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$);

** достоверность различий опытных проб с полиоксидонием/даларгином от проб без полиоксидония/даларгина ($p < 0,05$).

совсем не влиял на пролиферацию МС и стимулировал их апоптоз в большей степени, чем ПО.

Иннокуляция мышам ДА, в отличие от ПО, способствовала увеличению в селезенке и лимфатических узлах доли клеток, содержащих в ядрах более 3-х аргирофильных гранул (табл. 2). Как известно, выявление активности белков, аффинных к серебру в области ядрышкового организатора (AgNOR), косвенно отражает пролиферативный потенциал в клеточном звене иммунитета у биомоделей при доклинической характеристике вакцин [19].

Важно, что в макрофагах под влиянием ПО и ДА происходили принципиально различные структурные изменения, о чем свидетельствовали результаты сравнительного проточно-цитометрического анализа фагоцитов животных 5-й и 6-й групп по степени их внутриклеточной гранулярности (табл. 3). Показателем степени гранулярности клеточной популяции в наших исследованиях служила доля клеток (в %), регистрируемых при цитометрии в области R1 цитограммы, где по интенсивности бокового светорассеяния (SS) учитывались в контроле мышинные фагоциты с повышенным содержанием на клетку лизосомальных гранул, что характерно для подавляющего числа резидентных ПМ (рис. 1).

Как следует из таблицы 3, резидентные ПМ, в норме содержащие большее число цитоплазматических гранул на клетку, чем МС, под влиянием ПО мигрировали на 3-е сутки из брюшной полости, где доля их снижалась с 80 до 20%, в селезенку, так

как для МС показатель степени гранулярности наоборот резко увеличивался в этот срок с 8 до 47%. В отличие от ПО, ДА индуцировал фактически полное исчезновение макрофагов с исходно высоким содержанием лизосомальных гранул из брюшной полости. При этом фагоциты высокой степени гранулярности в селезенке не появлялись.

С помощью световой микроскопии у животных 6-й группы мы отмечали накопление макрофагов в брюшной полости и селезенке. По-видимому, ДА обладает способностью вызывать дегрануляцию мышинных макрофагов путем воздействия на их цитоплазматические гранулы, либо поверхностные клеточные рецепторы, запускающие процесс дегрануляции.

На введение только вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (группа 2) мышинные ПМ отвечали интенсивной дегрануляцией на 3-и сутки иммуногенеза. Доля макрофагов с исходно высокой степенью гранулярности резко снижалась в брюшной полости животных в 20 раз и в последующем на 21-е сутки достигала только 16%. При этом подавляющее число фагоцитов в сравнении с контролем еще оставалось в состоянии дегрануляции (см. табл. 3).

Полученные нами экспериментальные данные косвенно подтверждают факт персистенции вакцинного штамма в клетках макрофагально-фагоцитарной системы мышей [20], поскольку известно, что дегрануляция фагоцитов – это своеобразный

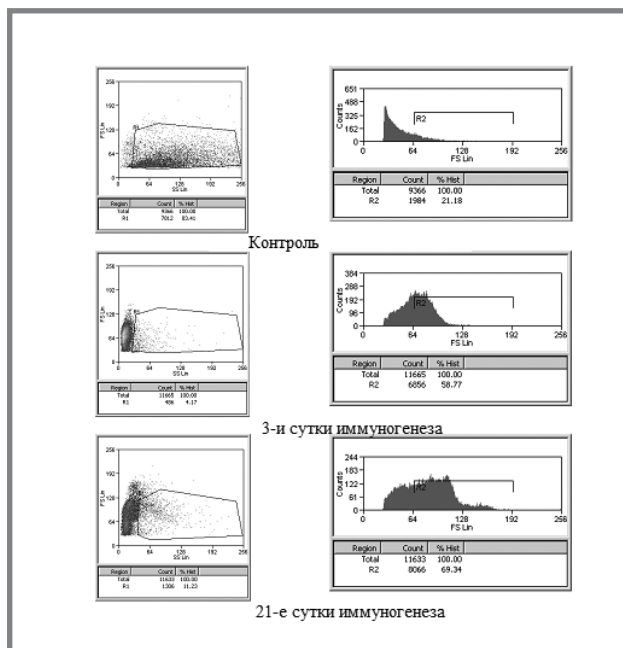
Таблица 2.

Характеристика состояния области ядрышкового организатора (AgNOR) в лимфоцитах селезенки и регионарных лимфатических узлах мышей линии Balb/c, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ на фоне введения полиоксидония или даларгина

Группа животных	Срок после иммунизации (сутки)	Селезенка				Регионарные лимфатические узлы			
		Количество AgNOR на 1 ядро лимфоцитов ($M \pm m$)	Ядра с различным количеством гранул AgNOR, %			Количество AgNOR на 1 ядро лимфоцитов ($M \pm m$)	Ядра с различным количеством гранул AgNOR, %		
			1	2	≥ 3		1	2	≥ 3
1. Контроль	3	$1,53 \pm 0,32$	41,9	51,6	6,5	$1,59 \pm 0,17$	61,3	29	9,7
	21	$1,54 \pm 0,63$	40,9	19,6	9,5	$1,34 \pm 0,19$	61,0	33	6,0
2. <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	3	$2,5 \pm 0,62$	64,0	22,6	13,4	$2,62 \pm 0,34$	29,4	20,6	50,0
	21	$2,96 \pm 0,17^*$	29,7	44,3	26,0	$2,88 \pm 0,32^*$	17,4	23,9	58,7
3. <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ + полиоксидоний	3	$1,96 \pm 0,28$	43,0	54,0	3,0	$2,25 \pm 0,84$	8,5	38,9	52,6
	21	$2,06 \pm 1,13$	34,1	45,7	20,2	$2,7 \pm 0,13$	7,0	40,2	52,8
4. <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ + даларгин	3	$1,4 \pm 0,13$	72	22	8	$2,25 \pm 0,71$	37,5	25	37,5
	21	$1,8 \pm 0,51$	56,1	17,1	26,8	$3,54 \pm 0,96^*$	6,25	20,8	72,95
5. Полиоксидоний	3	$1,33 \pm 0,12$	41,9	56,6	1,5	$1,96 \pm 0,19$	56,0	41,0	3,0
	21	$1,42 \pm 0,24$	39,9	55,6	4,5	$1,87 \pm 0,21$	52,0	43,0	5,0
6. Даларгин	3	$2,01 \pm 0,19$	51,5	18,2	30,3	$2,15 \pm 0,24$	45,2	24,2	30,6
	21	$2,7 \pm 0,75$	20,8	37,7	41,5	$1,75 \pm 0,12$	33,9	25	41,1

Примечание: *достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Рисунок 1.
Увеличение размера перитонеальных макрофагов
на фоне их интенсивной дегрануляции после
иммунизации мышей Balb/c *F.tularensis* 15 НИИЭГ



Примечание: в области R1 по оси абсцисс локализованы макрофаги с высоким содержанием цитоплазматических гранул; в области R2 от 64 до 192 условных единиц FS локализованы более крупные клетки, чем в области до 64 условных единиц.

индикатор функциональной активации их бактерицидных систем в условиях воздействия инфекционного агента [16, 21].

Наглядно ситуацию, отражающую функциональные изменения в макрофагах при моделировании противотуляремийного вакцинного процесса, иллюстрируют характерные цитогаммы (рис. 1), где фагоциты с исходно высокой степенью гранулярности в норме локализируются по SS в области R1, но исчезают из этой области после иммунизации. На 3-е сутки иммуногенеза фактически все макрофаги учитывались в области цитогаммы, где по низким значениям показателя степени гранулярности обычно регистрируются лимфоциты крови, либо фагоциты, утратившие свои цитоплазматические гранулы в результате дегрануляции [16]. На рисунке 1 представлены также гистограммы распределений макрофагов по объему (FS-малоуголовому светорассеянию), из которых следует, что после вакцинации в неоднородной популяции мышинных ПМ в большом количестве появлялись более крупные активированные фагоциты, в которых не только развивался процесс дегрануляции, но и изменялся метаболизм клетки в сторону синтеза необходимых для иммуногенеза белков.

Чтобы зарегистрировать методом проточной цитометрии факт повышения уровня продукции белка в клетках, нет необходимости в использовании длительной и дорогостоящей процедуры окраски их по суммарному белку FITC или другим флуорох-

Таблица 3.
Перераспределение спленоцитов, перитонеальных макрофагов и макрофагов селезенки мышей линии Balb/c по размеру и степени гранулярности в разные сроки после иммунизации *F. tularensis* 15 НИИЭГ на фоне введения полиоксидония или даларгина

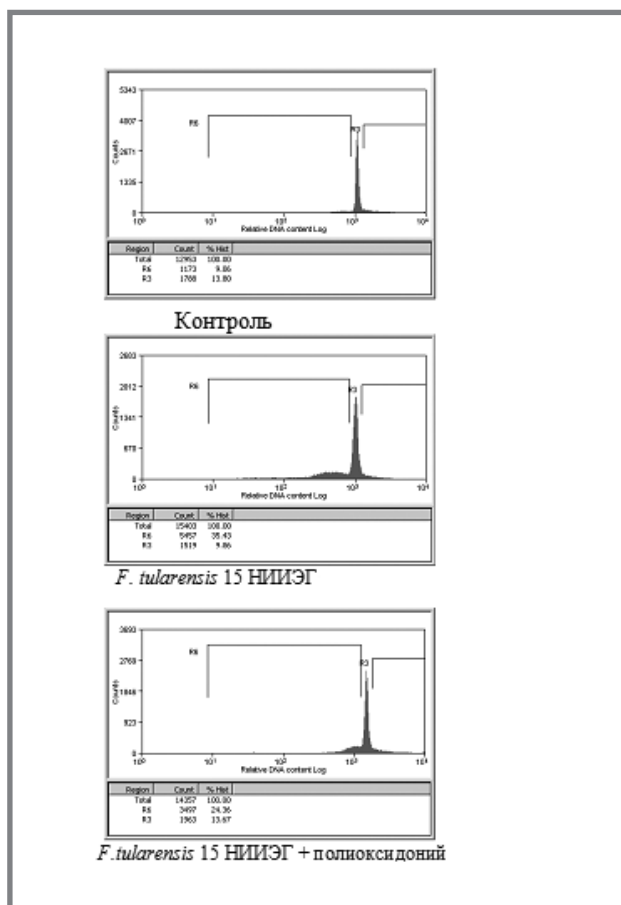
Группа животных	Срок после иммунизации (сутки)	Относительное содержание клеток с высоким значением исследуемого показателя (M ± m %)					
		Спленоциты		Перитонеальные макрофаги		Макрофаги селезенки	
		гранулярность	объем	гранулярность	объем	гранулярность	объем
1. Контроль	-	8,6 ± 1,3	12,8 ± 4,7	81,1 ± 1,2	21,9 ± 2,6	8,4 ± 2,2	15,6 ± 1,8
2. <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	3	13,9 ± 0,9	63,5 ± 1,8*	4,6 ± 0,9*	66,5 ± 4,9*	5,9 ± 0,3	48,5 ± 2,5*
	21	16,5 ± 0,1*	33,5 ± 2,6	16,0 ± 5,0*	73,5 ± 4,2*	10,8 ± 0,4	35,2 ± 2,6*
3. <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ + полиоксидоний	3	12,5 ± 0,5	65,9 ± 1,4*	9,8 ± 0,2*	67,4 ± 2,8*	5,7 ± 0,7	46,1 ± 1,6*
	21	5,2 ± 0,14**	60,9 ± 0,3*	27,7 ± 3,5*	78,5 ± 1,0*	10,1 ± 0,3	50,7 ± 2,8*
4. <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ + даларгин	3	20,4 ± 0,4*	23,6 ± 0,2	6,1 ± 1,2*	62,0 ± 4,8*	17,8 ± 1,8**	22,8 ± 1,3**
	21	18,7 ± 0,1*	33,3 ± 0,5**	2,7 ± 0,2*	66,3 ± 0,2*	9,4 ± 1,6	24,0 ± 0,4*
5. Полиоксидоний	3	10,2 ± 1,0	15,1 ± 1,3**	19,4 ± 2,2*	45,8 ± 1,2*	46,9 ± 1,2**	60,7 ± 2,6*
	21	4,7 ± 0,5**	25,2 ± 3,7	42,2 ± 1,2**	62,8 ± 1,7*	4,8 ± 0,6	11,6 ± 3,4
6. Даларгин	3	22,1 ± 0,04*	28,3 ± 0,8**	3,8 ± 0,04*	80,5 ± 0,7*	6,5 ± 0,5	22,7 ± 1,4
	21	6,7 ± 0,4**	27,7 ± 0,9	2,7 ± 0,2*	71,3 ± 1,1*	7,1 ± 0,1	23,6 ± 0,1*

Примечание: * достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$);

** достоверность различий опытных проб с полиоксидонием/даларгином от проб без полиоксидония/даларгина ($p < 0,05$).

Рисунок 2.

Цитофлуориметрические гистограммы, иллюстрирующие модуляцию пролиферативной активности и апоптоза макрофагов селезенки полиоксидонием на 21-е сутки после иммунизации мышей Balb/c *F. tularensis* 15 НИИЭГ



Примечание: R3 – область гистограммы, соответствующая пролиферирующим клеткам (более 2С ДНК); R6 – область, соответствующая апоптотическим клеткам (менее 2С ДНК).

ромом. Достаточно, как доказано в исследованиях с В-лимфоцитами [15] и бактериями [22], получить информацию о перераспределении отдельных клеток в популяции по объему (размеру), так как этот показатель строго коррелирует по данным проточной цитометрии с уровнем продукции суммарного белка в отдельных клетках. Как видно на гистограмме (см. рис. 1), в популяции ПМ доля более крупных активированных клеток с повышенным уровнем продукции белка (в области R2 от 64 до 192 условных единиц FS на гистограммах) увеличилась после вакцинации с 20 до 60 – 70%.

Выраженные функциональные сдвиги, связанные с перераспределением отдельных клеток по объему (по содержанию белка на клетку), регистрировали также в суммарных неоднородных популяциях СП животных 2-й группы, но не отмечали у мышей 5-й и 6-й групп (см. табл. 3). Литературные данные подтверждают, что при противотуляреминой вакцинации в мышинных СП действительно активируется синтез различных белков, в частности поверхностного маркера клеточной активации

CD69, интерферона-гамма и других цитокинов. Кроме того, к 21-м суткам иммуногенеза в крови иммунизированных животных появляются, как известно, антитела к специфическим антигенам туляремиального микроба [20, 23, 24]. В наших исследованиях титры антител у животных 2-й группы к 21-м суткам по результатам реакции агглютинации были относительно низкими (1:80).

Пролиферативная активность СП во 2-й группе животных повышалась на 3-и сутки иммуногенеза вдвое относительно контроля, но на 21-е сутки данный показатель возвращался к норме (см. табл. 1). Это подтверждалось повышением (в 1,5 – 2 раза) количества AgNOR-позитивных ядрышек в ядрах лимфоцитов селезенки (см. табл. 2). Пролиферация ПМ активировалась на 3-и и 21-е сутки, а МС только на 3-и сутки с последующим резким снижением к 21-м суткам до значения более низкого, чем в контроле. Под влиянием живых клеток вакцинного штамма туляремиального микроба у животных 2-й группы активировался апоптоз макрофагов (рис. 2), что в условиях подавления их пролиферации на 21-е сутки иммуногенеза сопровождалось дисбалансом этих двух процессов в клеточной популяции (см. табл. 1).

При исследовании методом проточной цитометрии клеток иммунной системы животных 3-й группы были выявлены важные особенности их реакции на иммунизацию живыми туляремиальными микробами, связанные с иммуномодулирующим эффектом ПО. Из таблиц 1 и 3 следует, что в данной группе пролиферация СП активировалась на 3-и сутки в большей степени, чем у животных 2-й группы и эти достоверные различия отмечались до 21-х суток иммуногенеза. До 21-х суток доля более крупных активированных клеток в суммарной популяции СП животных 3-й группы сохранялась на высоком уровне (около 60%), в то время как во 2-й группе через 3 недели она была значительно ниже (до 33,5%). Кроме того, у животных 3-й группы, благодаря описанному выше модулирующему эффекту ПО на макрофаги, регистрировали на 21-сутки резкое снижение доли ПМ в апоптозе, а также не обнаруживали в этот срок выраженного дисбаланса процессов апоптоза и пролиферации в популяции МС, наблюдаемого у животных 2-й группы (см. рис. 2 и табл. 1). Титры специфических антител у мышей 3-й группы были от 1:320 до 1:640, что существенно превышало титры антител у животных 2-й группы.

Применение ДА в качестве иммуномодулятора на фоне иммунизации культурой вакцинного штамма туляремиального микроба принципиально не влияло на процесс антителообразования. Титры антител у животных 4-й группы не отличались от титров антител у животных 2-й группы. Регистрировали более выраженные, чем в 3-й группе, изменения функционального состояния лимфоцитов, особенно в лимфатических узлах (см. табл. 2). В 4-й группе регистрировали самый высокий уровень повреж-

дения МС и не отмечали в их популяции тенденции к восстановлению баланса процессов апоптоза и пролиферации (см. табл. 1).

Выводы

1. Полиоксидоний, введенный интактным лабораторным животным, не изменяет, в отличие от даларгина, функциональное состояние лимфоцитов и не влияет на уровень их пролиферативной активности. Полиоксидоний запускает процесс миграции фагоцитов с повышенным содержанием цитоплазматических гранул из брюшной полости мышей в селезенку, в то время как даларгин изменяет функциональное состояние фагоцитов, вызывая их дегрануляцию.

2. В ответ на иммунизацию живыми клетками вакцинного штамма туляремии микроба активируется пролиферация лимфоцитов в селезенке и в регионарных лимфатических узлах мышечной линии Balb/c, а также апоптоз фагоцитов с развитием дисбаланса процессов апоптоза и пролиферации в неоднородных популяциях селезеночных и перитонеальных макрофагов.

3. При использовании полиоксидония в качестве иммуномодулятора при моделировании противотуляремии вакцинного процесса у мышечной линии Balb/c усиливается продукция специфических антител на фоне более длительной функциональной активации спленоцитов и пониженной интенсивности повреждения макрофагов в селезенке и брюшной полости.

Литература

1. Саяпина Л.В., Соловьев Е.А., Горяев А.А., Бондарев В.П. Изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЗГ в условиях длительного хранения. Проблемы особо опасных инфекций. 2015; 2: 87 – 91.
2. Каральник Б.В., Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Денисова Т.Г., Мельникова Н.Н., Тугамбаев Т.И. и др. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. Журнал микробиол. 2014; 6: 108 – 112.
3. Ключева С.Н., Шуковская Т.Н. Влияние адъювантов нового поколения *in vitro* на продукцию цитокинов клетками крови вакцинированных против чумы лиц. Российский иммунологический журнал. 2015; 9 (2): 201 – 208.
4. Ляпина А.М., Полянина Т.И., Ульянова О.В., Елисеев Ю.Ю., Телепнев М.В., Мотин В.Л., Федорова В.А. Применение полиоксидония для получения специфических антител к бактериальным антигенам. Современные проблемы науки и образования. 2012;
5. Киселева Е.П. Новые представления о противоишемическом иммунитете. Инфекция и иммунитет. 2011; 1: 9 – 14.
6. Silva M.T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. J. Leukocyte Biology. 2010; 87: 1 – 14.
7. Pham C.T. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2008; 40 (6 – 7): 1317 – 1333.
8. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. Цитокины и воспаление. 2004; 3: 41 – 47.
9. Балачевский Б.В., Курзанов А.Н., Славинский А.А. Даларгин-индуцируемая модуляция функционально-метаболической активности нейтрофильных лейкоцитов. Успехи современного естествознания. 2008; 5: 75 – 77.
10. Silva T.M., do Vale A., dos Santos N.M. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. Apoptosis. 2008; 13: 463 – 482.
11. Mares C.A., Ojeda S.S., Morris E.G., Li Q., Teale J.M. Initial delay in the immune response to *Francisella tularensis* is followed by hypercytokinemia characteristic of severe sepsis and correlating with upregulation and release of damage-associated molecular patterns. Infect. Immunity. 2008; 76: 3001 – 3010.
12. Фримель Х. Иммунологические методы. Москва. Медицина; 1987: 472.
13. Сибиряк С.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск. Бумажный двор; 2008:195.
14. Bi Y., Du Z., Yang H., Guo Z., Tan Y., Zhu Z., Yang R. Reduced apoptosis of mouse macrophages induced by *yscW* mutant of *Yersinia pestis* results from the reduced secretion of YopJ and relates to caspase-3 signal pathway. Scand. J. Immunol. 2009; 70 (4): 358 – 367.
15. Iritani B.M., Eisenman R.N. C-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. PNAS. 1999; 96 (23): 13180 – 13185.
16. Sklar L.A., Oades Z.G., Finnay D.A. Neutrophil degranulation detected by right angle light scattering: spectroscopic methods suitable for simultaneous analysis of degranulation or shape change, elastase release, and cell aggregation. J. Immunology. 1984; 133 (3): 1483 – 1487.
17. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург. СпецЛит; 2010: 96.
18. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. Experientia. 1980; 36: 1014 – 1015.
19. Бугорова С.А., Шуковская Т.Н., Курылина А.Ф. Ядрышкового аппарата лимфоцитов – как индикатор функциональной активности лимфоидных органов при доклинической оценке вакцин. Проблемы особо опасных инфекций. 2015; 2: 75 – 78.
20. Комбарова Т.И. Алгоритм отбора и предварительной оценки кандидатов в вакцинные штаммы туляремии микроба. Автореф.: дис. ... канд. биол. наук. Оболонск; 2013.
21. Houghton A.M., Hartzell W.O., Robbins C.S., Gomis-Roth F.X., Shapiro S.D. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. Nature Letters. 2009; 460: 637-642.
22. Steen H.B., Boye E. Escherichia coli growth studied by dual parameter flow cytophotometry. J. Bacteriology. 1981; 145 (2): 1091 – 1094.
23. Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. Vaccine. 2013; 31(35):3485-3491. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.041.
24. Фирстова В.В., Павлов В.М., Горбатов А.А., Комбарова Т.И., Караулов А.В., Дятлов И.А. Формирование антитуляремии клеточного и гуморального иммунного ответа, индуцированного у мышей *F. tularensis* 15 НИИЗГ. Иммунология. 2014; 35 (3): 147 – 150.

References

1. Sayapina L.V., Solovjev E.A., Goryaev A.A., Bondarev V.P. Studies of immunological properties in *Francisella tularensis* vaccine strain 15 NIEG under extended storage conditions. Problems particularly dangerous infections. 2015; 2: 87 – 91 (in Russian).
2. Karalnik B.V., Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Denisova T.G., Melnikova N.N., Tugambaev T.I. The impact of immunomodulation on immunogenic and protective activity of live plague. Zhurnal mikrobiol., epidemiol. i immunobiol. 2014; 6: 108 – 112 (in Russian).
3. Klyueva S.N., Schukovskaya T.N. Effect of a new generation of adjuvants *in vitro* cytokine production by blood cells of vaccinated individuals against plague. Russian Immunological Journal. 2015; 9 (2): 201 – 208 (in Russian).
4. Ljapina A.M., Poljanina T.I., Ul'janova O.V., Eliseev Ju.Ju., Telepnev M.V., Motin V.L., Fedorova V.A. Application of polyoxidonium to produce specific antibodies to bacterial antigens. Modern problems of science and education. 2012. № 2. <http://www.science-education.ru/102-5729> (in Russian).
5. Kiseleva E.P. New concepts of anti-infective immunity. Infection and Immunity. 2011; 1: 9 – 14 (in Russian).
6. Silva M.T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. J. Leukocyte Biology. 2010; 87: 1 – 14.
7. Pham C.T. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2008; 40 (6 – 7): 1317 – 1333.
8. Pinegin B.V., Nekrasov A.V., Haitov R.M. Immunomodulator polyoxidonium: mechanisms of action and aspects of clinical application. Cytokines and inflammation. 2004; 3: 41 – 47 (in Russian).
9. Balachevskiy B.V., Kurzanov A.N., Slavinskiy A.A. Dalargin-induced modulation of the functional-metabolic activity of neutrophils. The success of modern science. 2008; 5: 75 – 77 (in Russian).

10. Silva T.M., do Vale A., dos Santos N.M. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis*. 2008; 13: 463 – 482.
11. Mares C.A., Ojeda S.S., Morris E.G., Li Q., Teale J.M. Initial delay in the immune response to *Francisella tularensis* is followed by hypercytokinemia characteristic of severe sepsis and correlating with upregulation and release of damage-associated molecular patterns. *Infect. Immunity*. 2008; 76: 3001 – 3010.
12. Frimel X. Immunological methods. Moscow. Medicine; 1987: 472 (in Russian).
13. Sibiryak S.V., Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Evaluation of apoptosis in immunological research. Clinical application. Chelyabinsk. Paper Yard; 2008:195 (in Russian).
14. Bi Y., Du Z., Yang H., Guo Z., Tan Y., Zhu Z., Yang R. Reduced apoptosis of mouse macrophages induced by yscW mutant of *Yersinia pestis* results from the reduced secretion of YopJ and relates to caspase-3 signal pathway. *Scand. J. Immunol.* 2009; 70 (4):358 – 367.
15. Iritani B.M., Eisenman R.N. C-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *PNAS*. 1999; 96(23): 13180 – 13185.
16. Sklar L.A., Oades Z.G., Finney D.A. Neutrophil degranulation detected by right angle light scattering: spectroscopic methods suitable for simultaneous analysis of degranulation or shape change, elastase release, and cell aggregation. *J. Immunology*. 1984; 133 (3): 1483 – 1487.
17. Korzhevskij D.Je., Giljarov A.V. Basics of histologic techniques. St. Petersburg: Ltd. Publishing SpetsLit; 201: 96 (in Russian).
18. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*. 1980; 36: 1014 – 1015.
19. Bugorkova S.A., Schukovskaja T.N., Kurylina A.F. Nucleolar apparatus of lymphocytes - as an indicator of the functional activity of lymphoid organs in the preclinical evaluation of vaccines. *Problems particularly dangerous infections*. 2015; 2: 75 – 78 (in Russian).
20. Kombarova T.I. Selection algorithm and preliminary evaluation of candidates for vaccine strains of tularemia microbe. Doctorate of biol. sci. diss. Obolensk; 2013 (in Russian).
21. Houghton A.M., Hartzell W.O., Robbins C.S., Gomis-R th F.X., Shapiro S.D. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature Letters*. 2009; 460: 637 – 642.
22. Steen H.B., Boye E. *Escherichia coli* growth studied by dual parameter flow cytophotometry. *J. Bacteriology*. 1981; 145 (2): 1091 – 1094.
23. Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. *Vaccine*. 2013; 2; 31(35):3485 – 3491. doi: 10.1016/j.
24. Firstova V.V., Pavlov V.M., Gorbato A.A., Kombarova T.I., Karaulov A.V., Dyatlov I.A. The development of cellular and humoral immune responses, induced in mice by *Francisella tularensis* 15 NIEG. *Immunology*. 2014; 35 (3): 147 – 150 (in Russian).

Вакцинация детей с ревматическими заболеваниями¹

М.П. Костинов (vaccinums@gmail.com), А.А. Тарасова

ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва

Резюме

Освещены особенности вакцинации детей с ревматическими заболеваниями. Показано, каким образом схема иммунизации может быть изменена в зависимости от патологии и возраста ребенка.

Ключевые слова: иммунизация, дети с ревматическими заболеваниями

Vaccination of Children with Rheumatic Diseases

M.P. Kostinov (vaccinums@gmail.com), A.A. Tarasova

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera of Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract

Recommendations highlighted features vaccination of children with rheumatic diseases. It is shown how the immunization scheme may be changed according to the pathology and the age of the child.

Key words: immunization, children with rheumatic diseases

Особенности формирования специфического иммунитета

Вакцинация против гепатита В

Влияние заболевания в активном периоде и/или иммуносупрессивной терапии на выработку поствакцинальных антител находится в процессе изучения.

Эффективность вакцинации против гепатита В (ГВ) может достигать 60 – 68% у пациентов с ревматоидным артритом [25]. Несмотря на то, что синтез антител отмечается в поствакцинальном периоде у большинства пациентов, считается, что уровень их защиты не эквивалентен таковому у здоровых лиц [35].

Иммуносупрессивная терапия (преднизолон, метотрексат, препараты золота, нестероидные противовоспалительные средства) не оказывает заметного отрицательного влияния на уровень поствакцинального ответа [23, 25]. При этом продолжительность защиты недостаточна: 15 из 22 пациентов утрачивают анти-HBs уже через 7 месяцев после вакцинации.

В исследовании, проведенном в Турции, в котором участвовало 39 детей с ювенильным ревматоидным артритом (ЮРА), сравнивались две схемы введения вакцины против гепатита В: 0 – 1 – 3 и 1 – 2 – 6 месяцев. Содержание протективных антител было таким же как у здоровых, но лучший антителеный ответ был при иммунизации по второй схеме.