

ВАЖЛИВІСТЬ КІЛЬКІСНОЇ ОЦІНКИ ЧУТЛИВОСТІ УМОВНО-ПАТОГЕННИХ ГРИБІВ ДО АМФОТЕРИЦИНУ В ТА МІРАМІСТИНУ СТОСОВНО ЇХ КОМБІНОВАНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

Ю.Л. Криворученко, М.О. Кірсанова., О.М. Постнікова, Л.В.Тішкевіч
Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського

Досліджена чутливість 26 штамів патогенних дріжджоподібних грибів до антисептика Окомістину (0,01% мірамістину) та амфотерицину В (АФТ). Доведено, що Окомістин та АФТ ефективно пригнічували ріст 80% та 92% штамів відповідно. Тільки 4% штамів були стійкими до обох препаратів, що можна розглядати як аргумент на користь їхнього комбінованого застосування.

Ключові слова: дріжджоподібні гриби, антисептик мірамістин, амфотерицин В, чутливість, кількісний аналіз.

THE MEANING OF THE QUANTITATIVE EVALUATION OF OPPORTUNISTIC YEAST-LIKE FUNGI SUSCEPTIBILITY TO AMPHOTERICIN B AND MYRAMISTIN FOR THEIR COMBINED USE

Yu.L. Krivorutchenko, M.A. Kirsanova, O.N. Postnikova, L.V. Tishkevich
S.I. Georgievsky Crimean state medical university

Susceptibility of 26 strains of pathogenic yeast-like fungi to antiseptic Okomistin (0,01% myramistin), and amphotericine B (AFT) has been determined. Using quantitative methods it was shown that Okomistin and AFT could effectively inhibit growth of 80% and 92% fungal strains correspondently. Only 4% of the strains were resistant to both Okomistin and AFT that may be presumably considered as an argument for the combined use of these preparations.

Key words: yeast-like fungi, antiseptic myramistin, amphotericine B, susceptibility, quantitative tests.

Рецензент: д. мед. н. Л.В. Авдєєва

УДК 577.27:579.841.95:57.063.8

Г.Н. Джуртубаева, А.Г. Стопчанская, Н.А. Попова, А.Ю. Попов, Е.В. Ковбасюк

НАПРЯЖЕННОСТЬ КЛЕТОЧНО – ОПОСРЕДОВАННОГО ИММУНИТЕТА У ПРИВИТЫХ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНОЙ К ШТАММАМ *FRANCISELLA TULARENSIS* РАЗЛИЧНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ

ГУ “Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова”, Одесса

Фундаментальной основой специфического иммунитета у привитых живой туляремийной вакциной (ЖТВ) является селекция субпопуляций Т-лимфоцитов, инициирующих контроль репродукции вакцинного штамма и в меньшей степени вирулентного. Ревакцинация индуцирует клональную экспансию цитотоксических Т-лимфоцитов, усиливает цитодеструкцию всех типов клеток иммунной системы и естественной резистентности, а в ранние сроки — апоптоз клеток памяти. Характер цитопатических изменений зозинофилов и нейтрофилов отражает уровень специфической сенсibilизации у привитых, тромбоциты усиливают повреждающий эффект.

Ключевые слова: туляремия, вакцинопрофилактика, вирулентные, вакцинные штаммы, протективный иммунитет.

Для специфической профилактики туляремии в группах риска в странах СНГ, в том числе в Украине, используется живая туляремийная вакцина (ЖТВ). Несмотря на доказанную эффективность в США и странах Западной Европы ЖТВ не лицензирована из-за высоких требований безопасности, сложности стандартизации ее производства, слабой изученности создаваемого иммунитета. Противотуляремийный иммунитет является клеточно-опосредованным и, вероятно, определяется суммой антигенспецифических субпопуляций

© Г.Н. Джуртубаева, А.Г. Стопчанская, Н.А. Попова, А.Ю. Попов, Е.В. Ковбасюк

T-лимфоцитов к различным антигенам туляремиальных бактерий [2]. Изученные типы естественного и приобретенного иммунитета у больных туляремией и привитых ЖТВ, а также на различных животных моделях не выявили его природу и показатели, критичные для контроля инфекции [2, 3]. В определенной мере это связано с отсутствием экспериментальной модели, адекватно отражающей особенности иммунного ответа у человека, и исключительно слабой изученностью роли клеток миелоидно-макрофагального ряда в инициации и развитии иммунного ответа [4]. Практически не исследовано состояние специфического клеточного иммунитета у ревакцинированных ЖТВ людей.

Цель работы: определить *in vitro* уровень протективного иммунитета к штаммам *F. tularensis holarctica* различной вирулентности у привитых, выявить информативные критерии, характеризующие его защитный уровень и степень специфической сенсибилизации, идентифицировать возможные механизмы протективного иммунитета у привитых ЖТВ людей.

Материалы и методы

Клеточно-опосредованный иммунитет исследован у вакцинированных и ревакцинированных ЖТВ в различные сроки после прививки (1, 2, 5, 10 лет после вакцинации и 2, 3, 8 лет после ревакцинации). Методы выделения и культивирования лейкоцитов периферической крови (ПК) привитых, методология исследования взаимоотношений шт. *F. tularensis* с клетками ПК изложены [1]. Фрагментацию клеточной ДНК в культурах ПК, зараженных туляремиальными микробами, устанавливали с помощью электрофоретического анализа, используя ДНК-маркер М-28 (от 100 до 3000 базовых пар нуклеотидов). Для воспроизведения всего спектра иммунных реакций, развивающихся *in vivo* у привитых ЖТВ, использованы живые туляремиальные бактерии вирулентного штамма 359, изолированного от больного туляремией, а также вакцинный штамм 15, его SR- и R-варианты. Заражающая доза колебалась от 50 до 500 микробных тел на клетку и вызывала характерные морфологические изменения моноцитов-макрофагов ПК непривитых доноров в течение 24 часов сокультивирования.

Последовательные этапы развития иммунного ответа исследовали спустя 30 минут, 1–3, 7–8 и 24 часа от начала сокультивирования клеток и туляремиальных микробов.

Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ структурно-функциональных изменений под влиянием штаммов различной вирулентности клеток ПК вакцинированных и ревакцинированных ЖТВ людей в различные сроки после иммунизации позволил выявить наиболее информативные показатели, характеризующие напряженность клеточного иммунитета, степень специфической сенсибилизации, особенности вакцинального и ревакцинального иммунитета, способность клеточной тест-системы контролировать внутриклеточный рост туляремиальных бактерий.

Анализ спонтанной (контрольные препараты) и антигенспецифической бластной реакции лимфоцитов привитых ЖТВ людей выявил три четко морфологически дифференцируемые степени трансформирующего эффекта туляремиальных бактерий. Первая степень характеризуется наличием на препарате изолированных бластных форм, вторая — групп из 2–3 связанных между собой лимфобластов, и третья — кластеров и/или цепочек из 4–5 и более ассоциированных бластных форм. Этапность деспирализации ДНК и формирование лимфобласта в присутствии вакцинного штамма отчетливо прослеживается на голограммах (рис. 1) и полученных при изучении фазовой структуры клеток ПК привитых ЖТВ людей с помощью созданного в НИИ физики Одесского национального университета им. И.И. Мечникова микроскопного компьютерно-управляемого комплекса.

При выраженной специфической сенсибилизации, как правило, у ревакцинированных ЖТВ людей наблюдается крупносетчатая структура хроматина части бластных форм. У непривитых наблюдали лишь 1 степень бласттрансформации лимфоцитов, у вакцинированных ЖТВ — 1 степень спонтанной и 2–3 степень антигенспецифической бластной реакции лимфоцитов и невысокий уровень повреждения лимфобластов. У ревакцинированных резко возросло число и тяжесть повреждения лимфобластов (цитоскелеты, вытекание содержимого ядра) уже в первые часы сокультивирования с туляремиальными бактериями при наличии 2–3 степени бласттрансформации, что указывает на усиление после ревакцинации аллергического компонента.

Снижение интенсивности трансформирующего эффекта выявлено при наличии признаков репродукции туляремиальных бактерий в клеточной тест-системе через 10 лет после вакцинации ЖТВ и 8 лет после ревакцинации, а также под влиянием

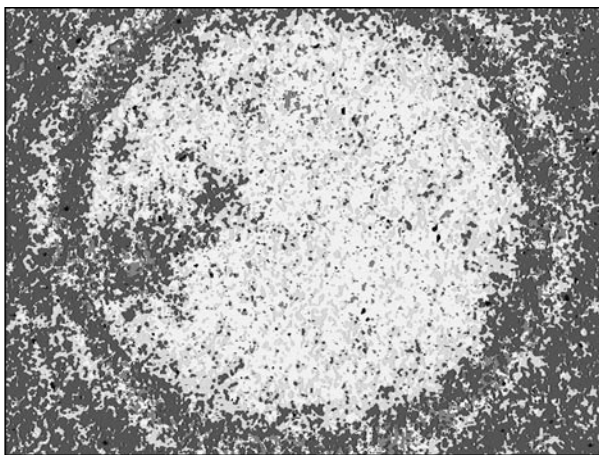
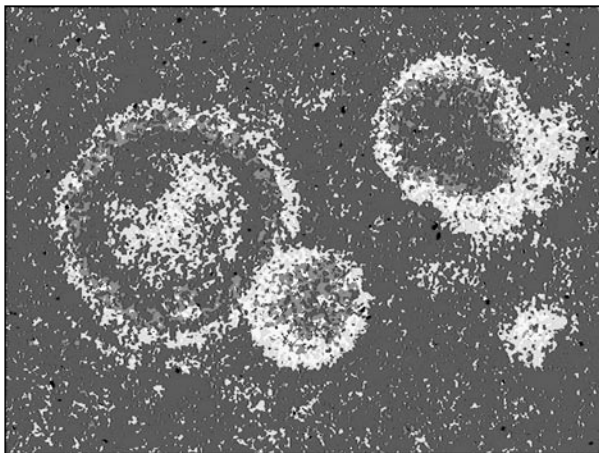


Рисунок 1. Стадии формирования лимфобластов

вирулентного штамма. Последний факт указывает на различную композицию иммунодоминантных антигенов вакцинного и вирулентного штаммов, утрату первым ряда детерминант вирулентности, что приводит к индукции у привитых ЖТВ не всего набора антигенспецифических субпопуляций Т-лимфоцитов, необходимых для полной защиты макроорганизма от вирулентного возбудителя. Эти результаты коррелируют с данными о клональной экспансии субпопуляции V γ 9V δ 2Т-клеток у больных туляремией, но не у привитых ЖТВ [5].

Следует отметить, что все варианты вакцинного штамма стимулировали бласттрансформацию лимфоцитов, однако интенсивность и сроки ее развития значительно различались. Под влиянием SR-варианта переходные формы лимфоцитов и отдельные бласты наблюдали уже через 2 часа после контакта с клетками ПК, а спустя 7 часов большинство лимфоцитов имели бластную форму. В присутствии R-варианта процесс бласттрансформации был более замедлен с пиком равным 24 часам. Сходная динамика этого процесса обна-

ружена под воздействием штамма 15. При этом у вакцинированных преобладал трансформирующий эффект, а у ревакцинированных — цитодеструктивный, который более интенсивен под влиянием SR-варианта вакцинного штамма.

Величину специфической сенсибилизации устанавливали по степени цитоморфологических изменений эозинофилов: слабая степень характеризуется низкой хемотаксисной активностью (размеры микровыростов не превышают размеры клеток) и отсутствием значительных изменений ядерной структуры, умеренная характеризуется высокой хемотаксисной активностью (размеры микровыростов превышают размеры клетки) (рис. 1), ориентированной концентрацией гранул вдоль цитоплазматической мембраны, выходом части гранул из клетки и их ассоциацией с клетками-эффекторами, нарушением целостности плазматической мембраны на участке контакта с нейтрофилом и/или тромбоцитами, изменением структуры ядер.

При высокой степени специфической сенсибилизации наблюдались глубокие цитодеструктивные изменения клетки (рис. 2). Интенсивность и сроки развития описанных изменений зависели от кратности прививок (вакцинация, ревакцинация) и сроков, прошедших после иммунизации. У вакцинированных ЖТВ людей выявлены, главным образом, признаки слабой степени специфической сенсибилизации и лишь в ранние сроки после прививки (1–2 года) обнаруживалась умеренная степень.

Высокая степень специфической сенсибилизации выявлялась только у ревакцинированных ЖТВ. Дифференциация реакции эозинофилов по

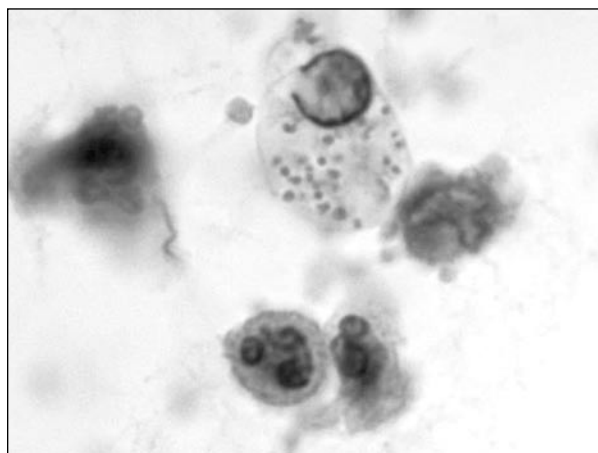


Рисунок 2. Деструкция эозинофила. Окраска гематоксилин-эозином, 1200x

степени специфической сенсibilизации позволяет оценивать величину специфического аллергического компонента у привитых и использовать эозинофилы в качестве клеток-индикаторов специфической сенсibilизации.

Важным критерием оценки специфической сенсibilизации у привитых является реакция на туляремийные бактерии нейтрофилов: активация или подавление хемотаксисной активности, коллоидальное осмотическое набухание и апоптоз (рис. 3).

У вакцинированных ЖТВ в первые часы сокультивирования клеток с туляремийными бактериями усиливалась хемотаксисная активность нейтрофилов, а в сроки 7–24 часов — развивались последовательные этапы апоптоза. У ревакцинированных основным наиболее демонстративным признаком гиперсенсibilизации являлось коллоидальное осмотическое набухание нейтрофилов (рис. 3). При этом полностью прекращалась хемотаксисная активность клеток и процесс завершался апоптозом.

О наличии протективного иммунитета судили по сохранности структуры моноцитов-макрофагов. В присутствии вирулентного штамма у привитых с защитным эффектом от вакцинного штамма наблюдались цитодеструктивные изменения моноцитов-макрофагов и невысокий уровень репродукции возбудителя.

Во все исследованные сроки после иммунизации уже в первые 30 минут сокультивирования с вирулентным штаммом, наблюдалась тесная ассоциация Т-лимфоцитов вакцинированных ЖТВ с моноцитами-макрофагами, а при сокультивировании с вакцинным штаммом и его вариантами — с

нейтрофилами. У ревакцинированных ассоциация Т-лимфоцитов с нейтрофилами и эозинофилами ПК привитых приводила к развитию коллоидального осмотического набухания, что свидетельствует о появлении у ревакцинированных субпопуляции цитотоксичных Т-лимфоцитов с характеристиками CD8 — Т-лимфоцитов.

Эти данные свидетельствуют о наличии у вирулентных штаммов высокоспецифических компонентов, авидных к рецепторам моноцитов-макрофагов, а у вакцинного штамма и его SR- и R-вариантов — к нейтрофилам. Такое различие вызывает принципиально иную реакцию антигенспецифических Т-лимфоцитов, которые связываются с моноцитами-макрофагами в случае вирулентного штамма или с нейтрофилами при контакте с вакцинным штаммом. В результате в иммунный ответ включается различный спектр клеток, секретирующих неодинаковый набор медиаторов, ответственных за бактерицидный эффект. Сходные закономерности были обнаружены при исследовании кооперативных взаимодействий антигенспецифических В-лимфоцитов с другими типами клеток в тест-системе.

Установлено также активное участие тромбоцитов в развитии цитодеструктивных процессов клеток ПК привитых ЖТВ в иммунном ответе на туляремийные бактерии, высокую степень кооперации тромбоцитов с нейтрофилами, эозинофилами и макрофагами-моноцитами [6]. Высокая специфичность реакций иммунокомпетентных клеток привитых ЖТВ на близкие по антигенной структуре штаммы (15 штамм, его SR- и R-варианты), способность четко дифференцировать вирулентные и вакцинные штаммы свидетельствует о трудности получения вакцинного штамма, который способен индуцировать *in vivo* адекватные для вирулентного штамма субпопуляции Т- и В-лимфоцитов.

Выводы

1. Относительный защитный уровень иммунитета, создаваемый ЖТВ в отношении вирулентных штаммов *F. tularensis*, значительный уровень специфической сенсibilизации у ревакцинированных ЖТВ обосновывают необходимость более строгих подходов к определению показаний для иммунизации населения ЖТВ.

2. Выявленные закономерности функционирования различных звеньев иммунитета и способы оценки иммунного ответа у привитых ЖТВ могут быть учтены и использованы для установления иммунологической эффективности и безопасности

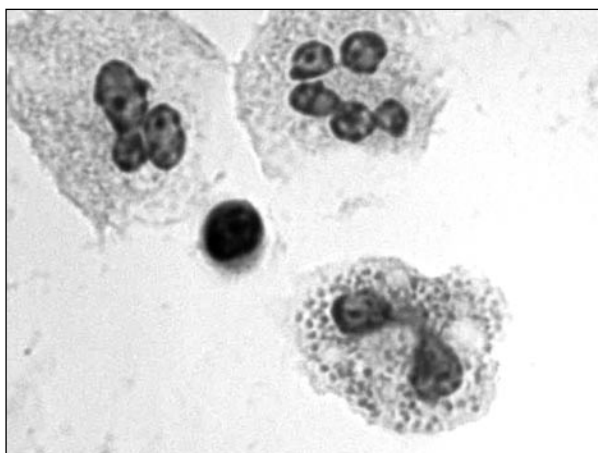


Рисунок 3. Коллоидальное осмотическое набухание нейтрофилов и эозинофила. Окраска гематоксилин-эозином, 1200х

других вакцинних препаратів і термінів їх повторних введення, що має особу актуальність в наші часи в зв'язі з недостатнім науковим обґрунтуванням схем вакцинопрофілактики багатьох інфекційних захворювань.

Перспективи дальніших досліджень. Необхідні дослідження, направлені на наукове обґрунтування схем вакцинопрофілактики інфекційних захворювань з урахуванням закономірностей функціонування різних ланок системи імунітету.

ЛІТЕРАТУРА

1. Патент на корисну модель № 49725 "Спосіб оцінки захисного рівня протитуберкульозного клітинного імунітету". Зареєстровано в державному реєстрі патентів України на корисні моделі 11.05.2010 р. Винахідник: Стопчанська А.Г., Заявник: Укр НДПЧІ ім. І.І. Мечникова.
2. Conlan J.W. Vaccines against *Francisella tularensis* — past, present and future / J.W. Conlan // *Expert Review of Vaccines*. — 2004. — Vol. 3, № 3. — P. 307–314.
3. Elkins K.L. Essential elements of protective immunity to *Francisella* // 6th International Conference on Tularemia 13–16 September 2009, Berlin, Charite Campus Mitte (CCM), 2009, S. 12–14. — P. 185.
4. Sigal L. Immunology and Inflammation: Basic mechanisms and clinical consequences / L. Sigal, Y. Ron (eds.), New York, NY: McGraw-Hill, 1994. — 805 p.
5. Predominant expansion of V gamma 9/V delta 2 T cells in a tularemia patient / T. Sumida, T. Maeda, H. Takahashi [et al.] // *Infect. Immun.* — 1992. — Vol. 60, № 6. — P. 2554–2558.
6. Tärnvik A. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis* / A. Tärnvik // *Rev. Infect. Dis.* — 1989. — Vol. 11, № 3. — P. 440–451.

НАПРУЖЕНІСТЬ КЛІТИННО-ОПОСЕРЕДКОВАНОГО ІМУНІТЕТУ У ЩЕПЛЕНИХ ЖИВОЮ ТУЛЯРЕМІЙНОЮ ВАКЦИНОЮ ДО ШТАМІВ *FRANCISELLA TULARENSIS* РІЗНОЇ ВІРУЛЕНТНОСТІ

Г.Н. Джуртубаєва, А.Г. Стопчанська, Н.А. Попова, А.Ю. Попов, О.В. Ковбасюк

ДУ "Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечникова", Одеса

Фундаментальною основою специфічного імунітету у щеплених живою туляремійною вакциною є субпопуляція Т-лімфоцитів, що ініціює контроль за репродукцією вакцинного штаму і значно в меншій мірі вірулентного. Ревакцинація індукує клональну експансію цитотоксичних Т-лімфоцитів, підсилює цитодеструкцію всіх типів клітин імунної системи та природної резистенції, а в ранні строки апоптоз клітин пам'яті. Цитопатичні зміни еозинофілів та нейтрофілів характеризують ступінь специфічної сенсibilізації у щеплених, тромбоцити підвищують руйнівний ефект.

Ключові слова: туляремія, вакцинопрофілактика, вірулентні, вакцинні штами, протективний імунітет.

INTENSITY OF CELLULAR-MEDIATED IMMUNITY IN THE VACCINATED BY ALIVE TULAREMIA VACCINE TO THE *FRANCISELLA TULARENSIS* STRAINS OF DIFFERENT VIRULENCE

G.M. Djurtubaeva, A.G. Stopchanskaya, N.A. Popova, A.Yu. Popov, O.V. Kovbasuk

SI "I.I. Mechnikov Ukrainian Research Antiplague Institute", Odessa

The fundamental basis of specific immunity in the vaccinated by alive tularemia vaccine (ATV) is a selection of T lymphocytes subpopulations, initiating the control of reproduction of the vaccine strain and less of virulent one. Revaccination induces clonal expansion of cytotoxic T-lymphocytes, strengthens self destruction of all types of cells of the immune system and natural resistance, and in the early stages — apoptosis memory. The nature of self pathologic changes of eosinophiles reflects and neutrophiles the level of specific sensitization of vaccinated persons, platelets enhance the damaging effect.

Key words: tularemia, vaccination, virulence, vaccine strains, protective immunity.

Рецензент: к. м. н. І.Л. Маричев