

Выводы. Анализ результатов проведенных экспериментов свидетельствует, что внутримышечное и ингаляционное введение ГХК не оказывает отрицательного воздействия на общее состояние животных, не вызывает деструктивных изменений в органах и тканях организма и аэрогематическом барьере легких, обуславливает выраженную активацию иммунокомпетентных клеток в лимфатических узлах и селезенке.

Полученные данные явились убедительным подтверждением безвредности и высокой иммуностимулирующей активности ГХК и показали перспективность дальнейших углубленных исследований свойств данного средства с целью внедрения в медицинскую и ветеринарную практику в качестве лечебно-профилактического средства для повышения резистентности организма.

Список литературы

1. Авиллов, Ч. Влияние стресс факторов на резистентность организма свиней [Текст] / Ч. Авиллов // Ветеринария с.-х. животных. – 2006. – № 3. – С. 46–47. 2. Изменение резистентности свиней при загрязнении окружающей среды средствами химизации [Текст] / Ю.А. Гаврилов [и др.] // Пути повышения эффективности научных исследований на Дальнем Востоке: I Примор. науч.-исслед. ин-т сел. хоз-ва. – Новосибирск, 2003. – Т. 2. – С. 305–309. 3. Долгих, В. Т. Основы иммунопатологии [Текст] / В.Т. Долгих. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2007. – С. 119–158. 4. Зиновьев, А.С. Морфологические методы при оценке напряженности иммунитета при инфекционных заболеваниях [Текст] / А.А. Зиновьев, А.В. Кононов // Архив патологии. – 1980. – № 10. – С. 72–74. 5. Вторичные иммунодефициты. Возможности использования отечественного иммуномодулятора Галавит [Текст] / Т.В. Латышева [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 95–99. 6. Максимов, Г.В. Состав липидов соматических нервов крысы при действии повреждающих факторов [Текст] / Г.В. Максимов, В.В. Ревин, М.А. Юданов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2006. – № 8. – С. 155–157. 7. Малкина, Е.Ю. Протективное действие ряда иммуномодуляторов и их влияние на активность макрофагов [Текст] / Е.Ю. Малкина, Т.Б. Мастернак, А.С. Ларин // Иммунология. – 1998. – № 1. – С. 33–36. 8. Применение иммуномодулятора ксимедона в качестве индуктора фермента N-ацетилтрансферазы [Текст] / В.И. Погорельцев [и др.] // Клинич. фармакология и терапия. – 2006. – № 2. – С. 82–85. 9. Влияние пиримидиновых производных на аденилатциклазную систему регуляции иммунокомпетентных клеток *in vitro* [Текст] / Ю.Д. Слабов [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – № 6. – С. 663–665. 10. Цибулькин, А.П. Иммунорегуляторные взаимодействия в системе ТН1-ТН2 лимфоцитов – основа развития, как патологического процесса, так и терапевтического эффекта ксимедона у пациентов с atopическими аллергическими заболеваниями [Текст] / А.П. Цибулькин, О.В. Скороходкина, Н.А. Цибулькин // Казанский мед. журн. – 2005. – № 2. – С. 87–91.

PATHOLOGISTOMORPHOLOGICAL EVALUATION OF XYMEDONE HYDROCHLORIDE IMMUNOGENIC EFFICIENCY

Murtazina G.Kh., Fazylov V.Kh.

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Zalyalov I.N.

Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after Bauman N.E., Kazan, Russia

Makayev I.Kh., Makayev Kh.N.

Federal Centre for Animals Toxicology, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

We have studied pathohistomorphologic changes of the animals' organism in order to control safety and immunostimulating activity of xymedone hydrochloride – a drug of the pyrimidine derivatives' aerogenic infusion. The result of experimental research conducted using 36 rabbits and 30 pigs proves that intramuscular and aerogenic infusion of xymedone hydrochloride doesn't show negative impact on the common state of the animals, doesn't cause destructive changes in organs and tissues of the organism, as well as aeroheumatic barrier in the lungs, cause significant activation of the immunocompetent cells in the lymphnodes and spleen. These data show the perspective of further deeper research of the properties of this substance with the purpose of introducing it in the medical and veterinary practice as an immunocorrecting substance.

УДК 619:616.981.42.07

МОДЕЛИРОВАНИЕ *IN VITRO* ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-МЕТОДА ОЦЕНКИ ЦИТОКИНИНДУЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ БРУЦЕЛЛЕЗНЫХ АНТИГЕНОВ

Плотникова Э.М., Панкова Е.В.

ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация

При ряде хронических инфекций бактериальной природы (туберкулез, бруцеллез и т. д.) наличие в сыворотке крови антител не всегда характеризует состояние противоиного иммунитета. При инфекциях, сопровождающихся внутриклеточной локализацией возбудителя, противоиного иммунитет осуществляется лимфоцитами и фагоцитами без участия антител, при котором антителам принадлежит не ведущая, а вспомогательная роль [1, 3].

Известно несколько способов оценки иммуногенности вакцинных препаратов с использованием серологических реакций (РА, РСК, РНГА), включая иммуноферментный анализ (ИФА). Недостатком этих способов является возможность получения недостоверной информации из-за наличия блокирующих антител, феномена «прозоны», а также наличия в организме гетерологичных микроорганизмов (иерсиний, туляремиий), которые обуславливают ложноположительные серологические реакции на бруцеллез [2, 4].

Цель работы. Разработка способа, позволяющего проводить экспресс-метод оценки иммуногенности различных вакцинных штаммов бруцелл *in vitro* без использования лабораторных и сельскохозяйственных животных и сокращение времени исследования.

Материалы и методы исследований. Поставленную задачу решали путем исследования биологической жидкости на наличие иммунорегуляторных цитокинов в иммунохимической тест-системе. Наличие иммунорегуляторных цитокинов определяли иммуноферментным анализом в культуральных супернатантах клеток периферической крови на содержание иммунорегуляторных цитокинов: фактора некроза опухолей (ФНО- α), интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и колониестимулирующего фактора (КСФ), синтезированных мононуклеарами периферической крови *in vitro* под воздействием антигенов бруцелл и по соотношению указанных цитокинов 1–1,25 (ФНО- α): 2–2,50 (ИЛ-1 β): 3–3,70 (КСФ) определяли иммуногенность изучаемых штаммов бруцелл.

Начальным этапом исследований являлось приготовление специфических антигенных фракций бруцелл путем радиоинактивации и лизиса микробных клеток. В качестве источника испытуемых антигенов-индукторов цитокинов *in vitro* тест-системе использовали инактивированные гамма-лучами антигены из штаммов *B. abortus* 19, R-1096, 82, 82 Пч, 82 Ц и единый бруцеллезный антиген.

Инактивацию бакмассы бруцелл проводили путем облучения культур на гамма-установке «Исследователь». Радиоинактивированные бруцеллы (радиоантигены) лизировали в растворе, приготовленном на 0,052–0,125 М трис HCl-буфере, pH 6,8, содержащем 2–5 % додецилсульфата натрия и 5 % меркаптоэтанола. Бактериальные клетки в лизирующем растворе прогревали на кипящей водяной бане в течение 1 мин., центрифугировали и супернатанты использовали в качестве испытуемых антигенов-индукторов цитокинов в *in vitro* тест-системе.

Определение спонтанной и индуцированной продукции цитокинов проводили по методике О.С. Солнцевой (2000).

Уровни спонтанной и индуцированной продукции цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α и КСФ) в супернатантах определяли с помощью стандартных тест-систем, разработанных в Государственном НИИ особо чистых препаратов (Санкт-Петербург), на основе «сэндвич»-метода твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

По результатам иммуноферментного анализа супернатантов с испытуемыми антигенами определяли наиболее активный индуктор цитокинов всех трех семейств (ИЛ-1 β , КСФ, ФНО- α), совместно обеспечивающих регуляцию иммунного ответа на всех этапах его развития. В целом эта группа эндогенных регуляторов обеспечивает самые разнообразные процессы, такие как: хемотаксис, изменение экспрессии антигенов и различных маркеров, переключение синтеза иммуноглобулинов, индукцию цитотоксичности макрофагов, формирование очага воспаления.

Результаты исследований. Опыты по определению уровня цитокинов в супернатантах клеток периферической крови, инкубированных в присутствии испытуемых антигенов различных штаммов бруцелл показали, что цитокин-индуцирующая активность испытанных штаммов бруцелл была вариабельной (табл.).

Таблица – Уровень спонтанной и антигениндуцированной продукции цитокинов (в пг/мл) ($M \pm m$)

Индуктор	ФНО- α		ИЛ-1 β		КСФ	
	Спонтанная	Индукцированная	Спонтанная	Индукцированная	Спонтанная	Индукцированная
АГ из шт.19	9,8 \pm 1,9	26,9 \pm 1,7	15,3 \pm 2,5	59,3 \pm 2,9	19,1 \pm 3,3	138,8 \pm 7,3***
АГ из шт.54	7,9 \pm 1,3	15,0 \pm 0,9*	15,9 \pm 3,3	151,8 \pm 9,8***	21,1 \pm 4,7	101,4 \pm 11,3***
АГ из шт.82 Ц	8,5 \pm 1,7	31,5 \pm 3,7	13,8 \pm 2,6	81,9 \pm 5,9**	18,9 \pm 5,1	119,2 \pm 15,3***
АГ из шт.82 Пч	8,8 \pm 2,3	34,2 \pm 4,1	14,1 \pm 2,2	76,8 \pm 4,5**	17,5 \pm 4,3	119,7 \pm 9,9***
АГ из шт.82	7,8 \pm 2,1	31,5 \pm 3,5	13,9 \pm 2,3	76,8 \pm 3,9**	18,3 \pm 5,5	114,1 \pm 7,7***
АГ из шт. R-1096	8,1 \pm 3,3	31,8 \pm 4,4	13,7 \pm 2,9	125,33 \pm 10,3***	19,3 \pm 3,9	62,5 \pm 2,7**

Как видно из таблицы, наиболее активным индуктором всех исследованных классов цитокинов является антиген из шт. 82Ц, который вызывал усиление спонтанной продукции ФНО- α в 3,70 раза ($P < 0,05$), ИЛ-1 β в 3,93 раза ($P < 0,01$) и КСФ-в 6,31 раза ($P < 0,001$). Антиген из шт. 82 Пч по цитокин-индуцирующей активности обладал почти идентичной активностью, незначительно (в 1,07 раза, $P > 0,05$) уступая по интерлейкин-индуцирующей активности (ИЛ-1 β) антигену из шт. 82 Ц, имея равную степень активности по способности синтезировать цитокины ФНО- α и КСФ. Антиген из шт. 82 имел аналогичную активность по способности усиливать продукцию цитокинов всех трех классов, отличаясь от предыдущих двух штаммов весьма незначительно, уступая по КСФ-стимулирующей активности предыдущим антигенам только в 1,04 раза ($P > 0,05$), уступая по интерлейкин-индуцирующей активности (ИЛ-1 β) антигену из шт. 82 Пч, имея равную степень активности по способности синтезировать цитокины ФНО- α и КСФ. В отличие от вышеуказанных антигенов бруцелл, антигены из штамма 19 и шт. R-1096, оказались менее активными усилителями цитокинов. Как видно из данных таблицы, ни один из них не является активатором всех трех классов цитокинов, поскольку они являются усилителями только одного класса цитокинов. Так, антиген из шт. 19 является усилителем цитокина КСФ-(138,8 \pm 7,3 пг/мл), шт. R-1096 цитокина ИЛ-1 β -(125,3 \pm 10,3 пг/мл). Указанные антигены бруцелл по способности синтезировать остальные классы цитокинов значительно (в 2,5 раза, чем АГ из шт. 19; 1,39 раза, чем АГ из шт.82 и в 1,30 раза, чем АГ из шт. 82 Пч и 82) уступали антигенам из других штаммов бруцелл.

По способности усиливать синтез иммунорегулирующих цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , КСФ) в модельной *in vitro* тест-системе испытанные антигены из штаммов бруцелл образуют следующий убывающий ряд: АГ из шт. 82 Ц > АГ из шт. 82 Пч > АГ из шт. 82 > АГ из шт. 19 > АГ из шт. R-1096.

Предлагаемый способ отличается тем, что для оценки поствакцинального иммунитета используется супернатант клеток периферической крови интактных животных, полученный путем инкубирования их в присутствии испытуемых антигенов из штаммов бруцелл и определения концентрации ключевых цитокинов иммуногенеза (ИЛ-1 β , ФНО- α и КСФ) в ИФА. Установлено, что наиболее активные усилители иммунорегуляторных цитокинов (антиген из шт. 82 Ц, 82 Пч, 82) обеспечивают синтез всех трех классов цитокинов, составляя соотношения их активности 1–1,25 (ФНО- α): 2 2,50 (ИЛ-1 β): 3 3,70 (КСФ). Использование других антигенов (шт. 19, R-1096) не обеспечивало полноценный синтез иммунорегуляторных цитокинов, что приводило к нарушению соотношения активности цитокинов (например, для шт. 19 это соотношение составляло 0,8 (ФНО- α): 2,26 (ИЛ-1 β): 3,30 (КСФ); для шт. R-1096-1 (ФНО- α): 4,03 (ИЛ-1 β): 1,93 (КСФ)).

Выводы. Таким образом, моделирование способа оценки иммуногенной активности различных антигенов бруцелл в *in vitro* тест-системе на инкубируемых культурах клеток-лимфоцитах показало, что под воздействием антигенов иммуноциты (лимфоциты периферической крови) синтезируют медиаторы иммуногенеза-цитокины, которые экспрессируются в межклеточное пространство (культуральную жидкость), детектируемое в высокочувствительной иммунохимической тест-системе-ИФА.

Список литературы

1. Ройт, А. Иммунология [Текст] / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – С. 20–160.
2. Исключение заболевания крупного рогатого скота бруцеллезом с использованием современных диагностических методов [Текст] / О.Д. Скляров [и др.] // Вет. врач. – 2010. – № 1. – С. 31–34.
3. Солнцева, О.С. Роль цитокинов в осуществлении atopических процессов клеток иммунной системы у лиц, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации [Текст] / О.С. Солнцева // Иммунология. – 2000. – № 3. – С. 22–24.
4. Comparative study of the immunobiological properties of life brucellosis vaccines [Text] / K.M. Salmacov [at al.] // Vaccine. – 2010. – Vol. 28. – S. 5. – P. 35–40.

MODELING IN VITRO TEST-SYSTEM FOR EXPRESS-METHOD OF ASSESSING THE CITOKINE-INDUCING ABILITY OF BRUCELLA ANTIGENS

Plotnikova E.M., Pankova E.V.

Federal center of toxicological, radiation and biological safety, Kazan, Russia

It's found that the most active inducer of all investigated classes of cytokines is an antigen from strain 82C, which caused increase of spontaneous production of TNF- α to 3.70 times ($P < 0,05$), IL-1 β to 3.93 times ($P < 0,01$) and CSF to 6.31 times ($P < 0,001$).

Antigen from strain 82PS on cytokine-inducing activity had almost identical activity slightly (to 1.07 times, $P < 0,05$) yielding to IL-1 β inducing activity of the strain 82 antigen, with an equal degree of activity on the ability to synthesize cytokines TNF- α and CSF.