

ИММУНОЛОГИЯ

- ü Реакции вируса африканской чумы свиней с антителами и причины отсутствия нейтрализации**
- ü Иммунологический алгоритм оценки протективного потенциала вирусных компонентов**
- ü Сравнительный анализ показателей функциональной активности гуморального и клеточного иммунитета при вирусных инфекциях**
- ü Асимметрия эффекторного звена в противоинфекционном иммунитете**
- ü Внутриклеточный паразитизм и протективный иммунитет**

РЕАКЦИИ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ С АНТИТЕЛАМИ И ПРИЧИНЫ ОТСУТСТВИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ*

Африканская чума свиней (АЧС) вызывается икосаэдральным цитоплазматическим дезоксирибовирусом, ранее классифицированным в отдельную группу семейства *Iridoviridae* [3]. Эта особо опасная инфекция не контролируется вакцинацией, так как до сих пор нет надежных средств ее специфической профилактики. Одной из причин недостаточной изученности иммунологии АЧС является отсутствие нейтрализации вируса антителами [4] - главного свойства других вирусов, составляющего традиционную основу изучения их иммуногенности со времени открытия серологических реакций. В этом отношении существует только один зоопатогенный аналог - парвовирус алеутской болезни норок, но известна также низкая способность к нейтрализации типичных представителей иридовирусов [8]. Было предпринято много попыток изучения этого уникального феномена, но удовлетворительного объяснения до сих пор не предложено; версий много - от отсутствия вирионных гликопротеинов до антигенной мимикрии и гетерогенности [13]. Хотя было показано, что наличие большого количества реконвалесцентной сыворотки (до 100%) во внеклеточной жидкости культуры свиных лейкоцитов сопровождается изолятоспецифическим подавлением репродукции вируса АЧС [7], феномен не может быть отнесен к нейтрализации вируса *in vitro* (по всем правилам постановки стандартной реакции нейтрализации), что признано и самими авторами.

* опубликовано в журнале «Доклады ВАСХНИЛ», 1991, 12, 27-31 совместно с М.С.Малаховой и Н.А.Власовым.

Наиболее общая точка зрения на феномен выражена Vinuela [14] и сводится к тому, что отсутствие нейтрализующих антител при АЧС связано не с отменой антигенпредъявляющих функций макрофагов при их заражении вирусом *in vivo*, а с природой вируса, главным образом, с его изменчивостью. Однако здесь автор учитывает роль вируса и антител и упускает из виду тест-систему, реализующую в конечном итоге сам феномен нейтрализации.

Поэтому цель настоящего исследования - дополнительная попытка выяснить причины отсутствия нейтрализуемости вируса АЧС, где, в отличие от известных работ, логика экспериментального анализа феномена предусматривала поэтапную систематическую регистрацию результатов взаимодействия вируса с антителами, вируса с чувствительными клетками в культуре и комплекса *вирус+антитело* с чувствительными клетками. Таким образом, предоставлялась возможность оценить роль каждого из трех элементов реакции нейтрализации, то есть вируса, антител и чувствительных клеток, с особым вниманием к последнему как тест-системе, участие которой в типичном случае должно быть отменено в результате образования иммунного комплекса и нейтрализации.

В работе использовали вирус АЧС, штамм Ф-32, умеренно вирулентный, гемадсорбирующий с титром не ниже 7,8 lg ГАЕ₅₀/мл, гомологичные антисыворотки от гипериммунных свиней, трехсуточную культуру прилипающей фракции клеток костного мозга свиньи (А-клеток КМС), охарактеризованную нами ранее [2]. Конъюгат антител с ферритином («Serba») готовили общепринятым способом [1]. Смесь осветленного центрифугированием при 5000 *g* в течение трех минут вируса с антителами в соотношении 1:1, а также с добавлением комплемента морской свинки (1%) инкубировали в разных режимах и титровали в культуре А-клеток КМС 10- и 2-кратными разведениями. Для иммуноэлектронной микроскопии суспензию А-клеток или вируса обрабатывали конъюгатом антител 1:1 в течение 60 минут при 37°C (для клеток в присутствии 0.08% азида натрия), промывали центрифугированием, фиксировали, заключали в смолу эпон-аралдит и готовили ультратонкие срезы по общепринятому методу [1]. Для характеристики репродукции вируса исследовали динамику его накопления титрованием по ГАЕ₅₀ и поглощения

предшественника синтеза ДНК 3H -тимидина.

По данным электронной и иммуноэлектронной микроскопии наружная оболочка вируса АЧС активна в рецепторном и антигенном отношении. Вирионы, имеющие оболочку, адсорбируются на эритроцитах свиньи, а антигены на их поверхности реагируют с антителами (рисунок 1/А, Б). Это соответствует данным, опубликованным в работах [5, 12].

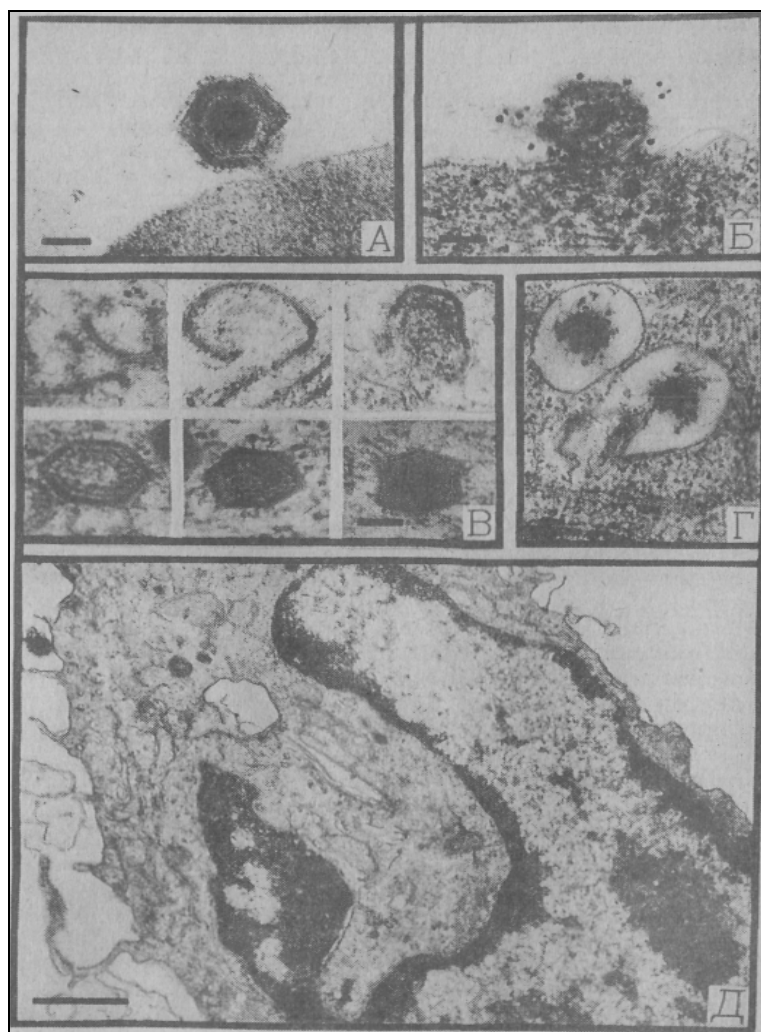


Рисунок 1. Электронная и иммуноэлектронная микроскопия взаимодействия вируса АЧС с чувствительными А-клетками КМС в культуре: А - адсорбция вируса на эритроцитах, встречающихся в культуре А-клеток; Б - комплекс вирус+конъюгат антител, адсорбированный на поверхности А-клетки; В - последовательные стадии морфогенеза вирионов; Г - комплекс вирус-конъюгат антител в фаголизосомах; Д - морфология интактной А-клетки в культуре. Длина масштабной полоски везде 100 нм.

Вместе с тем титрование инкубированного с антителами и комплементом вируса АЧС (таблица 1), как и ожидалось, показало отсутствие какого-либо нейтрализующего эффекта, в том числе и по типу комплементзависимого виролиза.

Таблица 1.
Влияние антител и комплемента на инфекционность
вируса АЧС ($n > 36$).

Реакционная смесь:			Условия инкубации:		Отношение титров обработанного и интактного вируса в культуре А-клеток КМС (% , $M \pm m$)
вирус	антитела	комплемент	° С	часы	
+	+	-	4	24	101.11±19.18
+	+	-	37	2	112.55±6.63
+	+	+	4	24	104.23±13.33
+	+	+	37	2	98.66±12.66

Данные о репродукции вируса АЧС в культуре А-клеток КМС приведены в таблице 2, на рисунках 1/В и 2. С учетом опубликованных данных о том, что этот вирус без специальной адаптации способен размножаться только в гемопозитических клетках естественно восприимчивых животных [13], можно сделать вывод об уникальности А-клеток как мишеней его действия. При этом следует отметить, что, согласно нашим данным [2], по функциональным и морфо-биохимическим критериям клетки этой фракции неотличимы от тканевых макрофагов, гистиоцитов и прочих зрелых клеточных форм системы мононуклеарных фагоцитов Ван Ферта (1973) в результате завершенности моноцитопоза в трехсуточной культуре.

На рисунке 1/Б и Г показаны адсорбция и внутриклеточная дезинтеграция вируссодержащего иммунного комплекса. Вместе с данными таблицы 1 они свидетельствуют о том, что иммунный комплекс беспрепятственно проникает в чувствительные клетки, а вирус сохраняет исходную репродуктивную активность.

Таблица 2.

Чувствительность к вирусу АЧС двух клеточных фракций КМС (n=6).

Клетки:			Множественность заражения (ГAE ₅₀ /клетка)	Урожай вируса на 4 сутки:		
фракции	объем суспензии (мл)	концентрация в мл (x10 ⁶)		Ig ГAE ₅₀ /мл	ГAE ₅₀ /клетка	соотношение
А-клетки	100	1.34±0.12	0.01	7.78±0.48	44.9	37.5
Пул неадгезивных клеток	100	1.82±0.21		6.34±0.32	1.2	

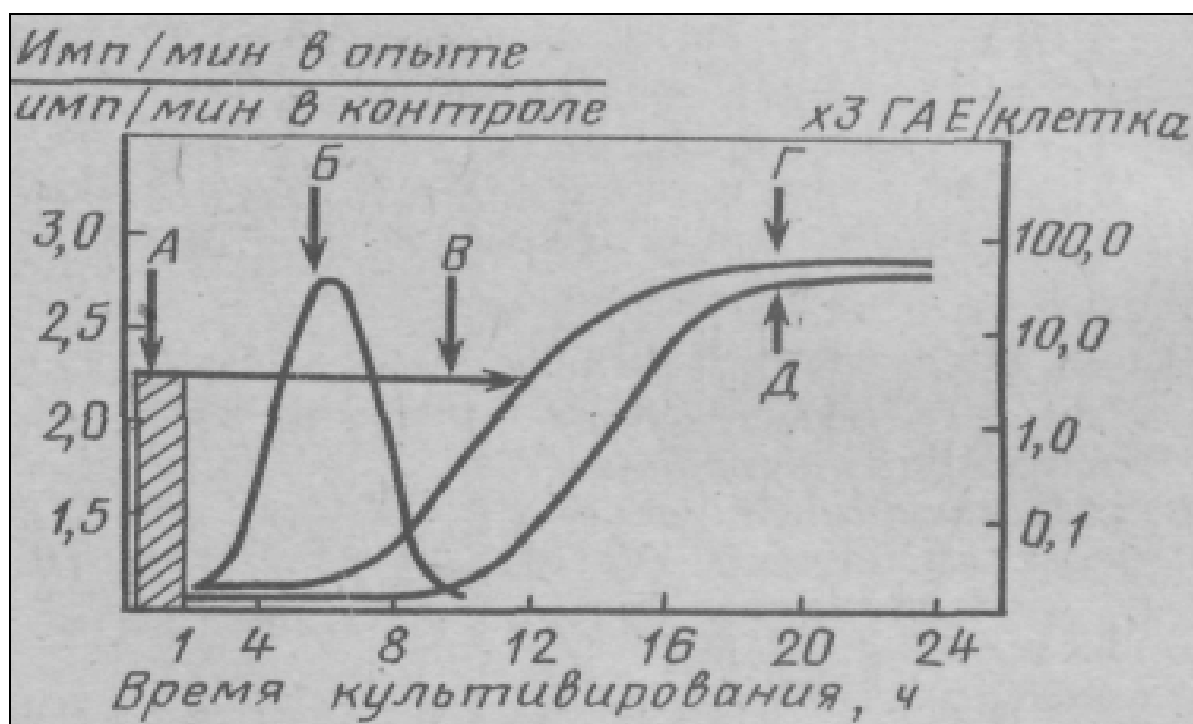


Рисунок 2. Обобщенная характеристика репродукции вируса АЧС в А-клетках КМС: А - множественность заражения, равная 10 ГAE₅₀/клетка; Б – динамика синтеза ДНК по поглощению ³H-тимидина, внесенного в среду в количестве 2 мКи/мл; В – продолжительность одиночного цикла репродукции; Г, Д – динамика накопления внутри- и внеклеточного вируса, соответственно.

Таким образом, в реакции вируса АЧС с антителами происходит взаимодействие всех трех вышеупомянутых элементов. Причины отсутствия его нейтрализуемости не связаны с первыми двумя компонентами реакции нейтрализации. Вирус и антитела в данном случае «функционируют» нормально. Однако А-клетки, или моноциты-макрофаги, как уникальная чувствительная клеточная система беспрепятственно репродуцируют вирусное потомство, вероятно, в связи со следующими обстоятельствами. Во-первых, из-за функционального назначения моноцитов-макрофагов и относительно крупных размеров вируса АЧС (180-220 нм) его проникновение в эти клетки в интактном виде осуществляется опсонин-независимым фагоцитозом, то есть здесь происходит рецептор-независимый эндоцитоз. В этом отношении наша точка зрения прямо противоположна таковой Alcamì et al. [3], чьи данные *de facto* не противоречат нашим, однако интерпретированы иначе. Мы постараемся обсудить это в специальной подробной публикации о взаимодействии вируса АЧС с макрофагами. Во-вторых, в таких условиях антитела в составе иммунного вируссодержащего комплекса будут не только не препятствовать проникновению вируса, но и играть роль опсонинов, реагируя с Fc-рецепторами моноцитов-макрофагов, и активировать фагоцитоз комплекса. Об этом свидетельствуют электронно-микроскопические данные субъективного порядка о сравнительно большем количестве опсонизированного вируса АЧС на одну фаголизому и фаголизом - на клетку. Электронно-микроскопическую картину поэтапного «зипперинга» иммунного комплекса в этом случае получить достаточно сложно, но визуализация последующих стадий фагоцитоза и успешная репродукция вируса косвенно указывают, что все происходит именно так. В-третьих, при таком взаимодействии наряду с неэффективностью нейтрализации начальных функций вируса АЧС не встречаются препятствий и рН-зависимые эндосомальные этапы в фаголизосомах (рисунок 1/В) по Collins, Porterfield [6]. В-четвертых, в процессе опсонизации, вероятно, уже не имеют значения те особенности комплексов *вирус+антитело*, которые определяют прямую (intrinsic) или косвенную (extrinsic) и др. типы нейтрализации по Mandel [9], связанные с конформационными изменениями антигенов в иммунном комплексе.

Из вышесказанного можно сделать общий вывод, что при АЧС «нейтрализация» вируса *in vivo* будет сопровождаться противоположным эффектом, то есть всеми возможными последствиями опсонизированного фагоцитоза - усилением вирусного размножения и экстенсивной патологией за счет распространения в организме инфицированных моноцитов-макрофагов по механизму «троянского коня», что установлено для целого ряда инфекций [10, 11].

В данной работе с вирусом АЧС удалось показать качественную сторону феномена. К сожалению, из-за отсутствия методических возможностей предварительного тестирования и определения титров антител в реакции нейтрализации нельзя было оценить роль количественного фактора в последствиях его взаимодействия с антителами, как это сделано в цитируемых источниках литературы.

Литература.

1. Королев М.Б. // Итоги науки и техники. ВИНТИ, сер. «Вирусология», 1980, т. 9.
2. Макаров В.В. // Вопросы вет. вирусол., микробиол., эпизоотол., Покров, 1987.
3. Alcamí A. et al. // Virus res., 1990, v. 17, № 2.
4. Boer C, de, et al. // J. Am. vet. med. assn., 1972, v. 160, № 4.
5. Brese S. et al. // Virology, 1967, v. 31, № 3.
6. Collins S., Porterfield J. // Nature, 1986, v. 321, № 6067.
7. Gonsalvo F., Camera M. // Am. J. vet. res., 1986, v. 47, № 6.
8. Kelly D. C. // J. Invertebr. Pathol., 1981, v. 38, № 3.
9. Mandel B. // Adv. Virus Res., 1978, № 23.
10. Peluso R. et al. // Virology, 1985, v. 147, № 1.
11. Porterfield J. S. // Nature, 1981, v. 290, № 5807.
12. Quintero J. et al. // Am. J. vet. res., 1986, v. 47, № 5.
13. Vinuela E. // Curr. top. microbiol. immunol., 1985, № 116.
14. Vinuela E. // Concept in viral pathogenesis II. Springer-Verlag, 1986.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ ПРОТЕКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ВИРУСНЫХ КОМПОНЕНТОВ*

Африканская чума свиней (АЧС) относится к группе наиболее упорных паразитозов, для которых получение защитных препаратов до сих пор остаётся нерешенной проблемой. Более того, анализ состояния вопроса свидетельствует, что для АЧС пока не существует какой-нибудь реальной и общепринятой версии относительно природы иммуногена и типа вакцинного препарата. Вместе с тем эта болезнь вирусной этиологии может служить своего рода моделью, исходя из её известных патогенетических и иммунологических особенностей, в числе которых важнейшими являются отсутствие нейтрализации биологической активности возбудителя антителами и роль клеток системы мононуклеарных фагоцитов в качестве критической клеточной и системной мишени [1].

Настоящая работа является итогом последовательного сравнительного исследования иммуногенной активности и протективного потенциала различных структурных и индуцированных антигенных компонентов вируса АЧС без живого возбудителя, взятых в виде сформированных естественным образом блоков, так, как они компартментализуются в процессе вирусной репродукции и взаимодействуют с компонентами иммунной системы организма. Мы ориентировались на классическую работу Stone, Hess [6], а также известные данные Bommeli et al. [3] и Forman et al. [4].

* опубликована в журнале «Вестник Россельхозакадемии», 1995, 6, 60-62
совместно с В.С.Перзашкевичем, А.Д.Середой, Н.А.Власовым,
В.В.Кадетовым.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 94-04-12076.

В статье использованы материалы сообщения на III Конгрессе
Европейского общества ветеринарных вирусологов, 4-7 сентября 1994 г.,
Швейцария.

Материалы и методы.

В работе использованы вирулентный изолят Ф-32 вируса АЧС европейской группы и его модифицированный пассажами в клетках костного мозга свиньи (КМС) культуральный авирулентный вариант ФК-135. Очистку культурального вируса проводили применением стандартных операций с преципитацией полиэтиленгликолем 6000 и центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Обработку антигенсодержащих препаратов для инактивизации, конъюгации, фиксирования бифункциональными агентами, детергентами и др. проводили по известным стандартным методикам. Использовали антигены с неполным адьювантом Фрейнда. Полноту инактивизации вирусных препаратов оценивали пятью последовательными пассажами в клетках КМС. Опыты с приготовлением и использованием липосом проводили по [5]. Принципиальные методические детали конкретных опытов приведены в соответствующих иллюстрациях. Характеристика антигенов в таблицах по исходному титру вируса, количеству белка или клеток отражает их общий числовой порядок. Для опытов использовали подсвинков массой 25-30 кг, которых иммунизировали двукратно с интервалом 14 дней, контрольное заражение проводили на 14 сутки после последней иммунизации инокуляцией 1000 ГАЕ₅₀ вируса Ф-32.

Результаты и обсуждение.

Первая серия экспериментальных данных посвящена исследованию антигенов интактного корпускулярного возбудителя (таблица 1). Здесь и далее результаты контрольного заражения выражены соотношением количества животных в опыте и защищенных, т.е. выживших. Поскольку *a priori* была известна неспособность очищенного вируса АЧС стимулировать защитный эффект [6], антигены конъюгировали с некоторыми субстанциями белковой природы и смешивали их с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ). И в нашем случае полученные результаты оказались отрицательными: из шестнадцати иммунизированных в этой серии опытов животных выжили, т.е. оказались защищенными, лишь трое.

Таблица 1.

Вирс	lg ГАЕ ₅₀ /мл	Инактивация + конъюгация:		Результаты контрольного заражения животных*
		агент	белок	
ФК-135	9.9-10.9	Глютаровый альдегид	Бычьи эритроциты	8 / 3
	9.7		БЦЖ (микобактерии)	2 / 0
ФК-32	9.7	2.4-толуилен-диизоцианат	Бычий гамма-глобулин	4 / 0
	9.7	Бисдиазобензидин + формальдегид		2 / 0

* здесь и далее по тексту - всего животных в опыте / в том числе выживших после контрольного заражения.

Следующая серия исследований посвящена оценке препаратов на основе очищенного разрушенного детергентами вируса, конъюгированных с бычьими эритроцитами (вариант ФК-135, титр вируса перед инактивацией до $10^{9.5}$ lg ГАЕ₅₀/мл, количество белка 31-180 мг) (таблица 2) и инаktivированных препаратов пулов вирусиндуцированных антигенов [по 3, 6] (изолят Ф-32) (таблица 3). Во всех случаях антигены смешивали с НАФ. Результаты изучения антигенных пулов, полученных из вирионов и заражённых субстратов (клеточные и тканевые антигены), несмотря на применение конъюгации с носителем или НАФ, показали, что эти препараты также не обладали протективными свойствами.

Таблица 2.

Детергенты	Антигенность в иммуноэлектроосмофорезе (с сыворотками реконвалесцентов)	Результаты контрольного заражения животных
Фреон-113	1 : 8	2 / 0
Додецилсульфат натрия	Не выявлен	2 / 0
Дезоксихлорат натрия	Не выявлен	2 / 0
Тритон Х-100	1 : 128	2 / 0
Нонидет Р-40	1 : 64	2 / 0
Бридж-58	Не выявлен	2 / 0

Таблица 3.

Источник антигенов	Инактивирующий агент	Количество белка (мг)	Результаты контрольного заражения животных
Лизат зараженной культуры клеток КМС	Димер этиленимина	60 - 90	2 / 0
Лизат селезенки больной свиньи	Октил-глюкозид	60 - 150	2 / 0
Иммуноаффинно очищенные антигены заражённых клеток КМС	-	8 - 12	2 / 0

Очевидным защитным эффектом обладали препараты цельных заражённых вирусом АЧС клеток КМС и перевиваемых клеток почки поросёнка (ППК). Результаты оценки препаратов инактивированных цельных клеток после заражения их вирусом (вариант Ф-135) при инаktivации клеток бифункциональными агентами в присутствии бычьего гамма-глобулина (40 мг/мл) с НАФ представлены в таблице 4. В этой серии опытов от заражения вирусом АЧС было защищено 10 из 14 подсвинков (> 70%).

Таблица 4.

Клетки	Концентрат клеток до инактивации:		Конъюгирующий и инактивирующий агенты	Антигенность в иммуно-электро-осмофорезе (с сыворотками реконвалес-центов)	Результаты контрольного заражения животных
	количество в иммунизирующей дозе, <i>lg</i>	титр вируса, <i>lg</i> ГАЕ ₅₀			
КМС	8.4 - 9.0	8.7 - 9.4	Глютар-альдегид	1:4 - 1:16	10 / 7
ППК	7.9	10.0		Бисдиазо-бензидин + формальдегид	1:64
				1:64	2 / 1

Эти данные послужили основанием для изучения вирусных антигенов, модулирующих мембрану заражённых клеток. Наиболее интересным в этом плане является мажорный неструктурный гликополипептид вируса АЧС с м.м. 110-140 кД (ГП 110-140), описанный нами ранее [2]. Оказалось, что в неденатурированном виде в составе липосом ГП 110-140 изолята Ф-32 вируса АЧС способен индуцировать защиту подсвинков от заражения гомологичным вирулентным вирусом (таблица 5).

Таблица 5.

Характеристика препарата	Доза ГП (мг)	Титр антител после иммунизации*	Результаты контрольного заражения животных
Пул ГП	8 - 10	1 : 60	2 / 0
Пул ГП в липосомах	8 - 10	1 : 300	2 / 0
ГП 110-140 в суспензии ПААГ**	0.3 - 0.5	1 : 4	2 / 0
ГП 110-140 в липосомах***	0.2 - 0.3	1 : 16	3 / 2

* в дот-ИФА с белками лизатов инфицированных А-клеток КМС в качестве антигена

** после электрофореза в восстанавливающих условиях

*** выделен последовательно изоэлектрофокусированием в неденатурирующих условиях и иммуноафинной хроматографией [2].

Важно, что ГП 110-140, согласно полученным данным, обладает в реакции радиоиммунопреципитации серологической специфичностью для гемадсорбирующих изолятов вируса АЧС разной иммунологической и географической принадлежности (рисунок). Его дальнейшее изучение открывает перспективы для количественного определения серологических связей разновидностей возбудителя и изыскания на его основе средств иммунопрофилактики АЧС.

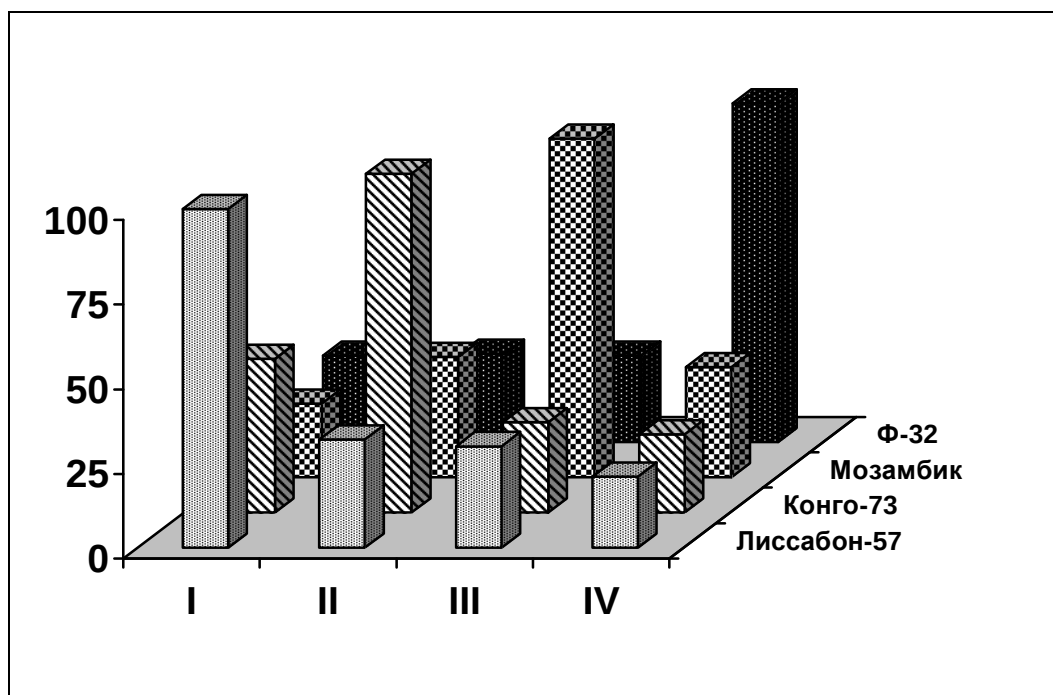


Рисунок. Изолято(серотипо)специфичность мажорного неструктурного ГП 110-140 вируса АЧС. Представлены данные перекрестного тестирования радиоактивности сорбированных на твердой фазе иммунных комплексов, состоящих из частично очищенных ионообменной хроматографией меченых ^3H -глюкозамином белков лизатов А-клеток КМС, инфицированных изолятами вируса I, II, III, и IV серотипов (соответственно Лиссабон-57, Конго-73, Мозамбик и Φ-32) с активными в РЗГА серотипоспецифическими антисыворотками (по горизонтали). Высокие столбики - 100% результаты реакции в гомологичной системе компонентов.

Вместе с тем последовательность иммунологического исследования вируса АЧС в направлении *корпускулярный возбудитель* $\rightarrow$ его *структурные компоненты* $\rightarrow$ *вирусиндуцированные белки* $\rightarrow$ *цельные заражённые клетки* $\rightarrow$ *изолированные вирусспецифические антигены (гликопротеины) мембран заражённых клеток* может служить неким общим алгоритмом поиска протективных антигенов при вирусных инфекциях.

Литература.

1. Макаров В.В., Малахова М.С., Власов Н.А., Чевелев С.Ф. Африканская чума свиней – модель взаимодействия патогена с системой моноклеарных фагоцитов. // Доклады Россельхозакадемии. 1992, № 11-12.
2. Середа А.Д., Макаров В.В. Идентификация изолятоспецифического гликополипептида вируса африканской чумы свиней. // Ветеринария, 1992, № 1.
3. Bommeli W., Kihm U., Ehrensperger F. Preliminary study on immunization of pig against African swine fever. In: African Swine Fever, Lux., CEC, 1983.
4. Forman A., Wardley R., Wilkinson P. The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. // Arch. Virol., 1982, 74, 2-3.
5. Liposomes and Immunobiology. Ed. by B. Tom and H. Six. Elsevier/North Holland, New York, 1980.
6. Stone S., Hess W. Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus. // Am. J. Vet. Res., 1967, 28.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ*

Для оценки иммунитета при вирусных инфекциях используются, как правило, тесты, выбранные эмпирически. Обычно применяется модельная реакция нейтрализации инфекционности возбудителя, по своей иммунологической сути очень далекая от явлений, развивающихся *in vivo* [4]. Вместе с тем, в зависимости от патогенетического стереотипа той или иной инфекции, эффекторные реакции развиваются неравномерно. Это явление определено нами как *асимметрия эффекторного звена*. Судя по данным литературы, идентификация наиболее иммунологически значимой эффекторной реакции представляет собой трудную экспериментальную задачу [2]. Поэтому в целом данная проблема до сих пор, по нашему мнению, не имеет достаточной концептуальной основы.

Цель настоящей работы - сравнить по наиболее общим характеристикам защитное действие двух основных ветвей эффекторного звена иммунного ответа при классической (КЧС) и африканской чуме свиней (АЧС). Выбор инфекций в данном случае обусловлен их исходной оппозицией по иммунологическому стереотипу: если при КЧС активность гуморальных вируснейтрализующих антител - основной показатель иммунитета [1], то при АЧС нейтрализация вируса отсутствует, но описаны прототипные реакции клеточного иммунитета, в частности, антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) и активность цитотоксических Т-лимфоцитов [3, 5, 6].

* опубликовано в журнале «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», 1995, 12, 599-602 совместно с И.Ф.Вишняковым, А.А.Коломыцевым и А.Д.Середой.

Методика исследования.

Для иммунизации подсвинков крупной белой породы 2-4-месячного возраста использованы вирус-вакцина ЛК-ВНИИВВиМ против КЧС и авирулентный вариант ФК вируса АЧС. Контрольное заражение проводили вирулентными штаммами Ши-Мынь вируса КЧС в дозе 10^3 ЛД₅₀ и Ф-32 вируса АЧС в дозе 10^4 ЛД₅₀. Характеристики использованных штаммов и вариантов вирусов, способы титрования вируса КЧС по ККИД₅₀ (50% инфекционная доза для культур клеток) в клетках РК-15 или вируса АЧС по ГАЕ₅₀ (50% гемадсорбирующая единица) в А-клетках костного мозга свиней, методы постановки реакций нейтрализации для вируса КЧС, АЗКЦ и тестирования цитотоксических Т-лимфоцитов для вируса АЧС описаны в предыдущих публикациях [1, 5, 6]. Ответ иммунизированных животных на контрольное заражение по группам статистически оценивали в процентах по защите от гибели, проявлению клинических признаков или приживлению вирулентного вируса (регистрируемой вирусемии). Частные условия отдельных опытов приведены по тексту.

Результаты исследования.

Гуморальный иммунитет при КЧС. Для анализа использовали результаты рутинного иммунологического контроля вирус-вакцины ЛК-ВНИИВВиМ. На рисунке 1 приведены суммарные данные, характеризующие реакции животных на контрольное заражение по трем показателям на фоне индукции гуморальных вируснейтрализующих антител при введении различных доз вакцины. Определение количества антител и контрольное заражение проведено на 14 день после иммунизации, количество подсвинков по группам - от 7 до 20. Для антител за 100% принят титр у животных, получивших максимальную дозу вакцины, за положительную вирусемию - титр вируса $\geq 0.63 \lg$ ККИД₅₀/мл крови, за клиническую реакцию - любые отклонения от нормы по сравнению с контролем от температурной реакции $\geq 40^\circ\text{C}$ до типичного симптомокомплекса.

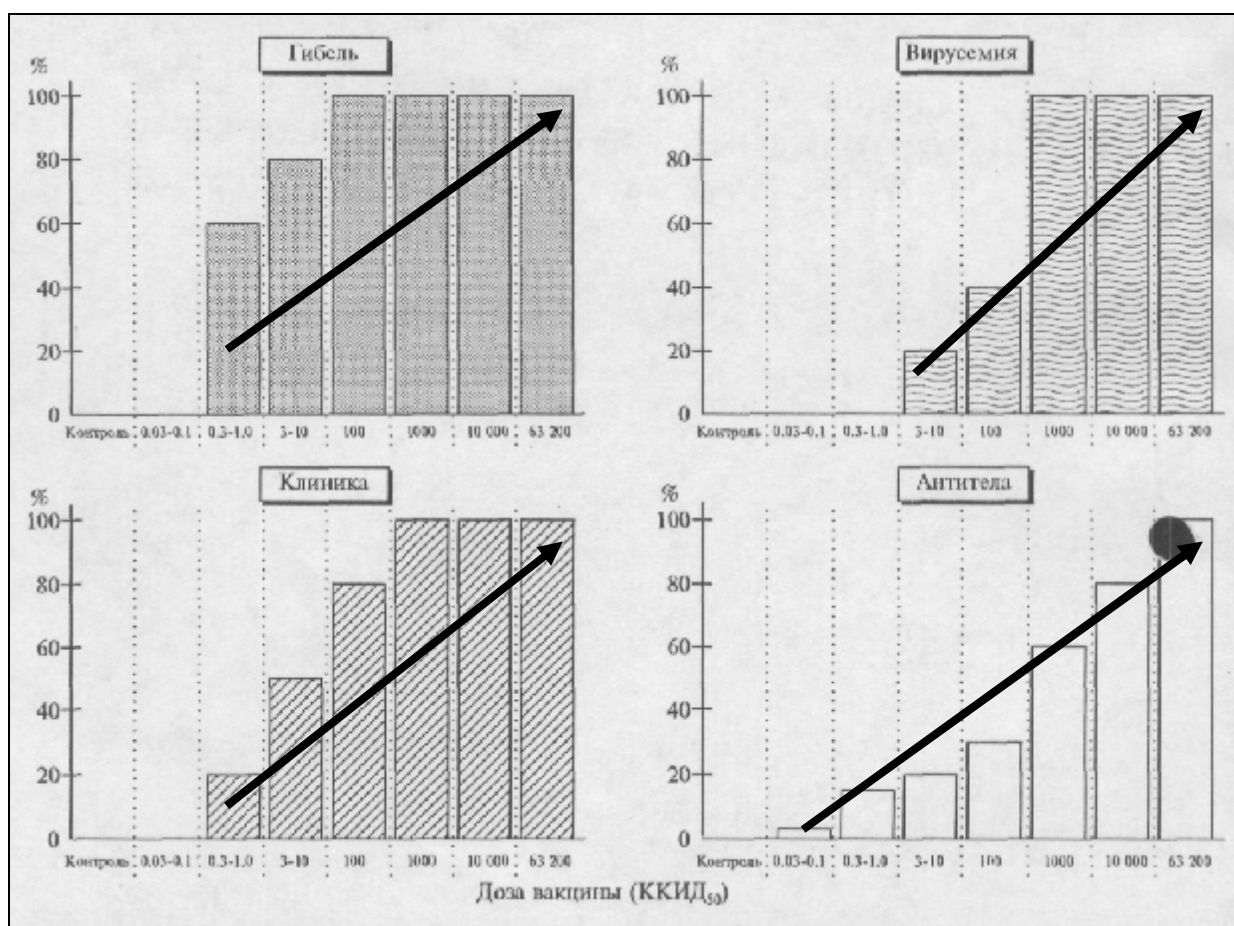


Рисунок 1. Защита от гибели, клинического проявления болезни, вирусемии после контрольного заражения и уровни вируснейтрализующих антител в зависимости от дозы вакцинного вируса при иммунизации подсвинков против КЧС.

Очевидно, что для данной инфекции существует выраженная положительная корреляция устойчивости животных с уровнем активности гуморального иммунитета (тренды показаны стрелками на рисунке 1): титры вируснейтрализующих антител прямо зависели от дозы инокулированного вакцинного вируса («реплицирующегося антигена»), а 100% защита животных достигалась при дозах вируса 1000 ККИД₅₀ и выше.

Клеточный иммунитет при АЧС. Как видно из данных рисунка 2, образование антител, активных в реакции АЗКЦ, при инокуляции авирулентного варианта ФК вируса АЧС характеризовалось «дозозависимым» ответом. Отмечена положительная корреляция между показателями специфического цитолиза и количеством инокулируемого вируса (тренд показан стрелкой).

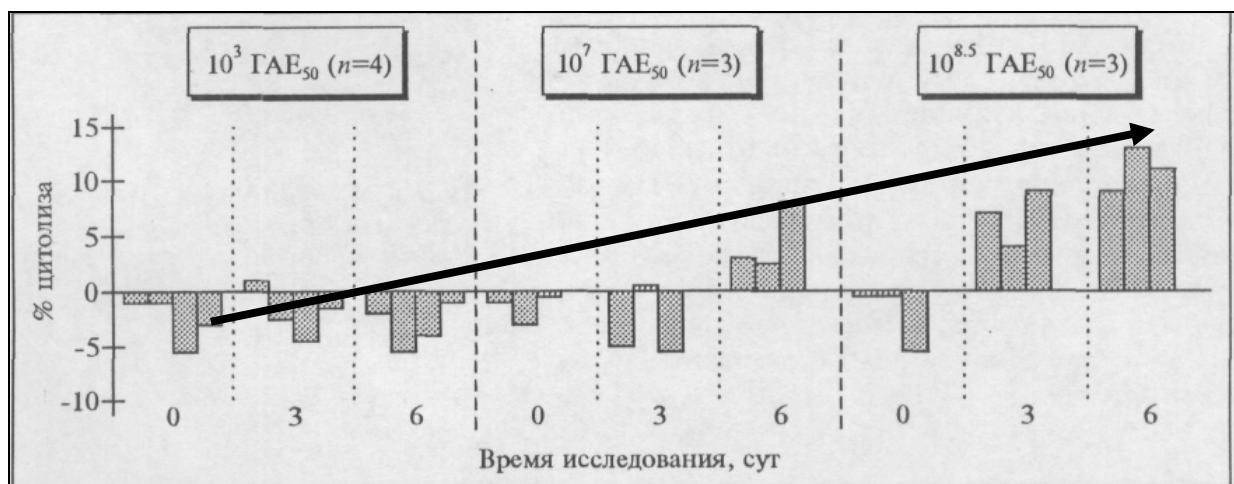


Рисунок 2. Активность антител в реакции АЗКЦ у подсвинков в зависимости от дозы авирулентного варианта ФК вируса АЧС.

На рисунке 3 приведены данные, характеризующие значение эффекторов АЗКЦ и цитотоксических Т-лимфоцитов как реакций клеточного иммунитета в защите при АЧС, по группе из 8 подсвинков. У животных, инокулированных авирулентным вариантом ФК вируса АЧС безотносительно к дозе, определяли показатели специфического цитолиза для реакции АЗКЦ на 3 и для Т-лимфоцитов - на 6 сутки. Именно эти 8 подсвинков были отобраны по полученным показателям, позволяющим установить некий градиент иммунных состояний по активности тестируемых эффекторов от 10-20% специфического цитолиза в АЗКЦ и 3-10% для Т-лимфоцитов у подсвинков №№ 1, 2 и 3 до полностью отрицательных результатов у подсвинков №№ 7 и 8. Контрольное заражение на 7 сутки характеризовалось выраженной температурной реакцией животных №№ 4-8, у которых не зарегистрирована специфическая активность цитотоксических Т-лимфоцитов. Устойчивость положительно коррелировала с наиболее высокими уровнями эффекторов АЗКЦ в сочетании с Т-лимфоцитами (показано трендами на рисунке 3).

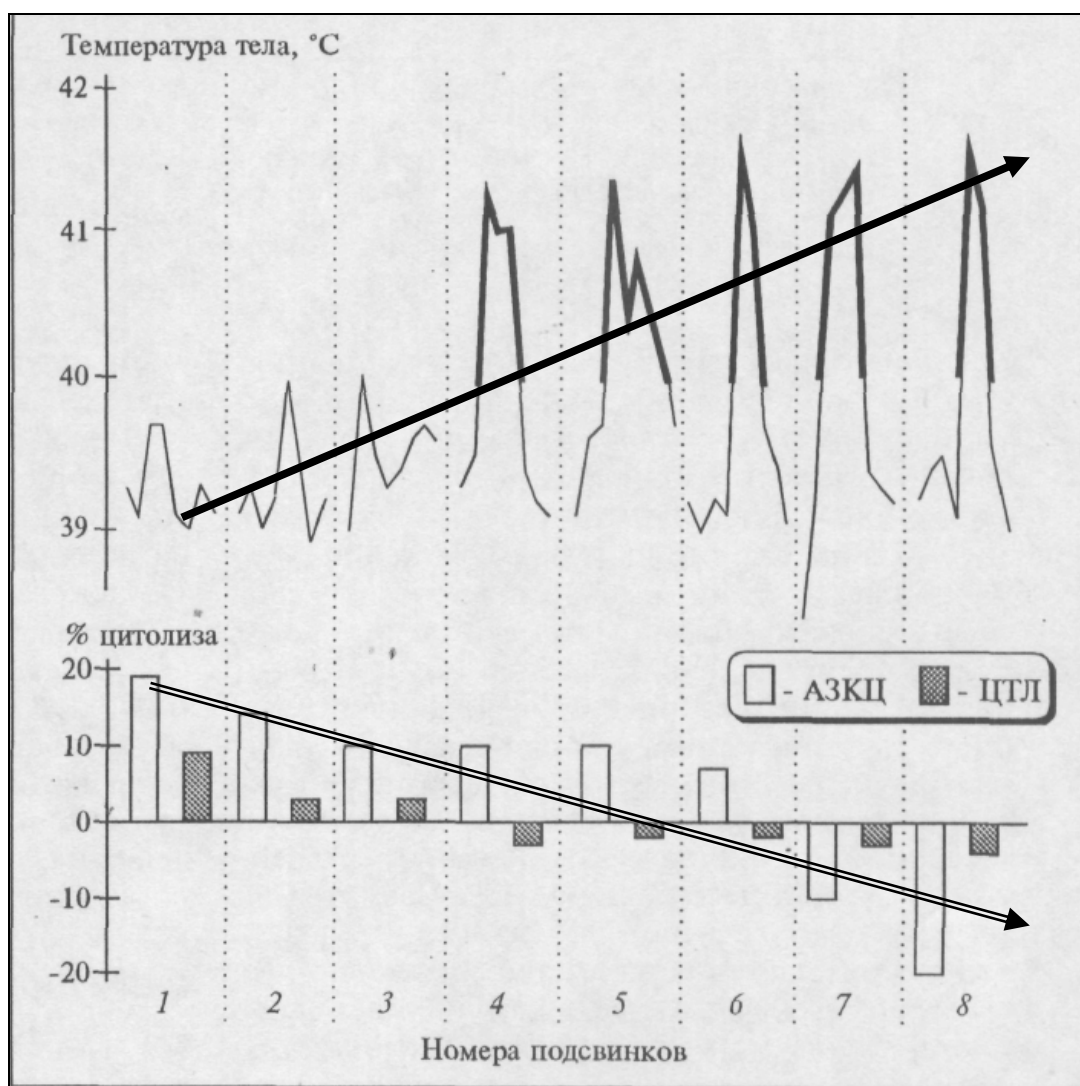


Рисунок 3. Результаты контрольного заражения в зависимости от специфической активности антител в реакции АЗКЦ и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) при АЧС.

Таким образом, сравнение двух основных ветвей эффекторного звена в иммунном ответе при вирусных инфекциях *in vivo* в общих чертах подтверждает концепцию его асимметрии. Полученные данные обосновывают необходимость дальнейшей детализации явления в направлении идентификации и оценки роли отдельных реакций в протективном противовирусном иммунитете *in vitro*, а также идентификации вирусных компонентов, ответственных за их индукцию.

[Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 94-04-12076)].

Литература.

1. Вишняков И.Ф., Митин Н.И., Карпов Г.М. и др. // Ветеринария. 1991, № 4, 28-31.
2. Колонцов А.А., Макаров В.В. // Вопр. вирусол. 1990, № 2, 97-101.
3. Колонцов А.А., Макаров В.В. // Сельскохозяйственная биол. 1993, № 4, 12-18.
4. Макаров В. В. // В кн.: Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии. Покров, 1985, 10-17.
5. Середа А.Д., Соловкин С.Л., Сенечкина Е.К. и др. // Сельскохозяйственная биол. 1994, № 6, 112-115.
6. Середа А.Д., Соловкин С.Л., Фугина Л.Г. и др. // Вопр. вирусол. 1992, № 3, 168-170.

АСИММЕТРИЯ ЭФФЕКТОРНОГО ЗВЕНА В ПРОТИВОИНФЕКЦИОННОМ ИММУНИТЕТЕ*

(Итоговый отчет о работе по проекту РФФИ № 94-04-12076)

Цель проекта - дать научно обоснованное решение вопроса о необходимости оценки протективной роли отдельных частных механизмов противоинфекционной иммунной защиты применительно к болезням, вызываемым возбудителями различной природы, идентификации ведущих элементов эффекторной системы организма и структур возбудителя, ответственных за протективный иммунитет.

В работе запланировано решение следующих задач:

- § определение общей характеристики клеточного иммунного ответа при африканской чуме свиней (АЧС) - инфекции, принятой в качестве базовой модели, выявление и количественная оценка субпопуляций Т-лимфоцитов;
- § сравнительное изучение функциональной активности клеточного и гуморального звеньев иммунитета при вирусных инфекциях *in vivo* с использованием АЧС и классической чумы свиней (КЧС) как оппозитных моделей по отношению к гуморальным факторам иммунитета;
- § идентификация и оценка роли отдельных иммунных реакций в протективном противовирусном иммунитете;
- § идентификация вирусных компонентов, ответственных за индукцию эффекторов протективного иммунитета при АЧС.

* опубликована в журнале «Вестник Россельхозакадемии», 1996, 2, 33-35.

Определены условия выделения Т-лимфоцитов свиньи и дана количественная оценка их субпопуляций, имеющих маркеры Т-хелперов и Т-супрессоров (Т_H и Т_S, соответственно). Эффективность выделения Т-лимфоцитов в градиенте плотности перколла и фиколл-пака зависела от условий центрифугирования, состава среды для розеткообразования с эритроцитами, условий диссоциации розеток (реагенты, температура), структуры эритроцитарных реагентов для розеткообразования. Установлено, что концентрация Т_H-лимфоцитов в крови свиней составляет 10.5 ± 0.2 , а Т_S-лимфоцитов 12.8 ± 0.6 , отношение Т_H/Т_S 0.84 ± 0.06 (эти данные подробно опубликованы в [1]). Показана возможность использования для тестирования первичных вирусспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) свиньи при АЧС культуры аутологичных лейкоцитов крови в качестве клеток-мишеней, которые сохраняли антигенпредъявляющую способность в процессе их культивирования после получения из крови и заражения в течение двух недель. Определены оптимальные соотношения эффектор/мишень для данной модели (в пределах 100-1000:1), динамика индукции ЦТЛ у животных (в интервале 2-14 суток с максимумом на 6-8 сутки) и возможность использования клеток-мишеней и эффекторов от генетически сходных по поверхностным детерминантам лимфоцитов животных-доноров из одного помета (по данным реакции смешанной культуры лейкоцитов). Формирование ЦТЛ отмечено только при инокуляции животным авирулентного варианта вируса АЧС в увеличенных дозах ($8.0 \lg \text{ГAE}_{50}$) [2].

Результаты анализа построенных карт рестрикции использованных в работе вирулентного изолята Ф-32 вируса АЧС (для контрольного заражения) и его авирулентного варианта ФК (для иммунизации) показали, что последний, значительно отличающийся от исходного по фенотипическим признакам (вирулентности, гемадсорбирующей способности), является его делеционным дериватом. Обнаруженные делеции размером в 0.5 и 1.5 тпн локализованы в параметрах 0.1-0.125 и 0.965-0.975 ед. физической карты генома, соответственно [3].

Для сравнения важнейших показателей функциональной активности гуморального и клеточного иммунитета *in vivo* изучен

иммунный ответ для оппозитных моделей - КЧС и АЧС. Гуморальный иммунитет оценивали по реакции животных на контрольное заражение (% погибших, проявивших клинические признаки заболевания или приживления вирулентного вируса) на фоне индукции гуморальных антител при введении различных доз вирус-вакцины ЛК-ВНИИВВиМ. Оказалось, что для КЧС существует выраженная положительная корреляция устойчивости животных с уровнем гуморального иммунитета (вируснейтрализующих антител), который прямо зависит от дозы инокулируемого вакцинного вируса («реплицирующегося антигена»). Низкие дозы вакцины (15-30 ИмД₅₀) защищали 50% животных от гибели и 20% - от переболевания. 10- и 100-кратное увеличение дозы приводило к повышению показателей защиты до 72 и 44%, 100 и 85% соответственно, что коррелировало с увеличением титров сывороточных антител. В этих опытах получена практически полезная дозо-зависимая количественная характеристика градиента возможных иммунных состояний организма животных - от ее отсутствия до полной невосприимчивости к заражению вирулентным вирусом (рисунок 1).

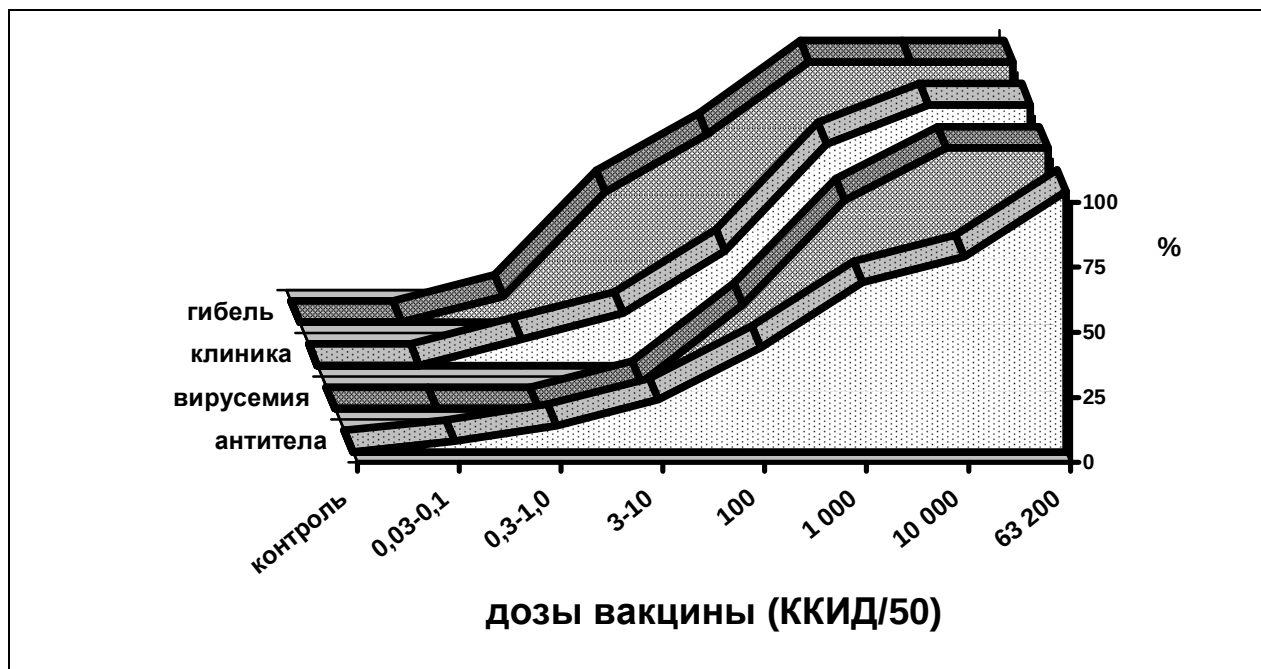


Рисунок 1. Защита от гибели, клинического проявления болезни, вирусемии после контрольного заражения и протективные уровни вируснейтрализующих антител (% животных) в зависимости от дозы вакцинного вируса при иммунизации подсвинков против КЧС.

В противоположность этому защита животных при АЧС была обусловлена активностью эффекторов клеточного иммунитета. Его изучение при АЧС у животных, инокулированных авирулентным вариантом ФК с последующим контрольным заражением вирулентным изолятом, оценивали по индукции ЦТЛ и образованию антител, активных в реакции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Также как в индукции вируснейтрализующих антител при КЧС, образование указанных эффекторов клеточного иммунитета при АЧС характеризовалось дозо-зависимым ответом. Отмечена положительная корреляция между показателями специфического цитолиза клеток-мишеней ЦТЛ, эффекторами АЗКЦ и количеством инокулируемого варианта ФК. К контрольному заражению были устойчивы только те иммунизированные животные, у которых отмечалась хотя бы определяемая активность ЦТЛ. Устойчивость также положительно коррелировала с наиболее высокими уровнями эффекторов АЗКЦ (показатели специфического цитолиза 10-20%) в сочетании с ЦТЛ. Сравнение двух основных ветвей эффекторного звена в иммунном ответе *in vivo* в общих чертах подтверждает концепцию его асимметрии при различных по иммунологическому стереотипу вирусных инфекциях. Из возможных эффекторных реакций при АЧС основную протективную роль играют ЦТЛ (рисунок 2) [4, 5].

Детальное электронномикроскопическое исследование позволило визуализировать на этом уровне цитолитические эффекты с участием ЦТЛ и в реакции АЗКЦ. Для этого использованы зараженная культура клеток костного мозга свиньи (КМС) в качестве источника мишеневых клеток мононуклеарных фагоцитов и клеток-эффекторов АЗКЦ (исходно присутствующих в гетерогенной культуре КМС), а также эффекторные ЦТЛ и антитела от иммунных животных. Установлено, что привлекающая ЦТЛ модуляция клетки-мишени ассоциированными с мембранами зараженных клеток вирусными белками-антигенами - объектами иммунной атаки при реализации цитолитических эффекторных механизмов и типичная для размножения вируса АЧС гемадсорбция - происходят без видимых признаков вирусиндуцированной клеточной деструкции, в период формирования виропласта, задолго до экзоцитоза (почкования) вирусных частиц и тем более формирования вирусного потомства.

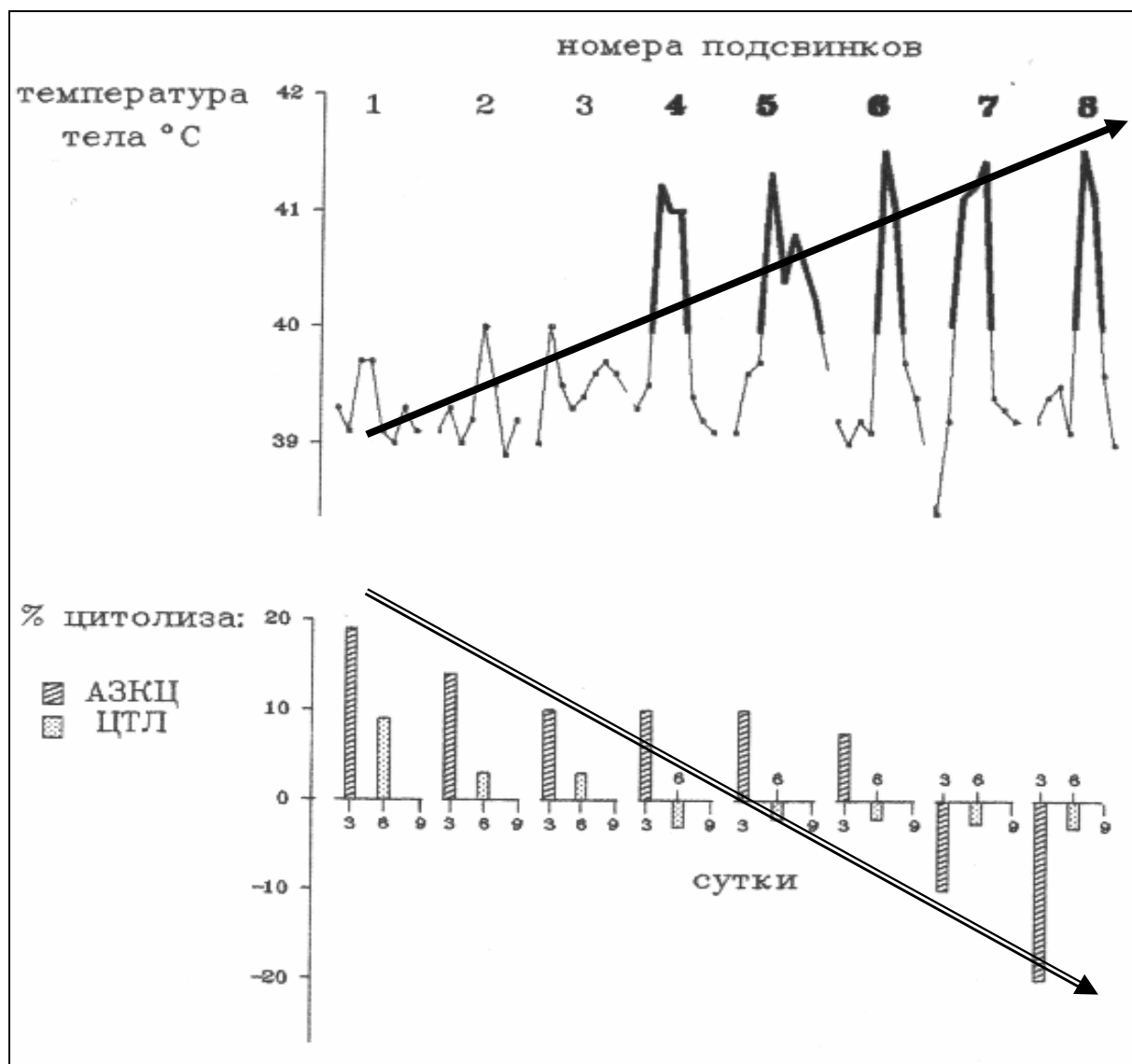


Рисунок 2. Результаты контрольного заражения в зависимости от специфической активности антител в реакции АЗКЦ и ЦТЛ при АЧС.

Атака ЦТЛ и гемадсорбция указывают на достаточную плотность вирусных мембранных антигенов в этой стадии цикла вирусного развития. (В этих наблюдениях важна аутентичность клеток-мишеней, которая подтверждалась наличием в них двух признаков, типичных для репродукции вируса АЧС, - виропластов и гемадсорбции.) Киллинг ЦТЛ клеток-мишеней характеризовался типичными морфологическими признаками апоптоза (реакция со стороны ядра в виде конденсации хроматина, образование протуберанцев, апоптозных тел и др.) [6, 7]. Сходная морфологическая картина на ультраструктурном уровне характерна

и для развития АЗКЦ, которая была опосредована макрофагами, гранулоцитами и лимфоцитами. При этом оказалось, что АЗКЦ и реакция задержки гемадсорбции (для последней объектами атаки служат также ассоциированные с мембранами зараженных клеток белки вируса АЧС) - два независимых процесса и могут одновременно протекать в присутствии иммунной сыворотки. Именно реакция АЗКЦ, воспроизведенная и визуализированная в культуре клеток КМС, объясняет определенные защитные эффекты гуморального иммунитета при АЧС в условиях отсутствия вирусной нейтрализации как таковой в иммунологическом стереотипе этой инфекции [8].

Оценка вирусных компонентов, ответственных за индукцию эффекторов протективного иммунитета, проведена путем сравнительного исследования иммуногенной активности различных структурных и индуцированных антигенных субстанций вируса АЧС, без живого возбудителя, взятых в виде сформированных естественных образом блоков, в которые они компартментализуются в процессе вирусной репродукции и взаимодействуют с компонентами иммунной системы организма. Оказалось, что препараты очищенного вируса, инаktivированного и конъюгированного с различными носителями (бычий эритроциты или гамма-глобулин, БЦЖ), не создавали защиты от контрольного заражения. Препараты на основе очищенного разрушенного детергентами вируса и инаktivированные препараты пулов вирусиндуцированных антигенов также не обладали протективными свойствами, несмотря на конъюгацию с носителем и применение адъюванта. Очевидным защитным эффектом обладали препараты цельных клеток КМС и перевиваемых клеток почки поросенка, зараженных вирусом АЧС и собранных на стадии максимального развития гемадсорбции (свидетельство максимума антигенной модуляции их мембран), инаktivированных бифункциональными агентами и с носителем (> 70% защиты) [9, 10].

Эти данные, полностью согласующиеся с вышеизложенными результатами идентификации и оценки роли прототипных эффекторов клеточного иммунитета при АЧС (ЦТЛ и АЗКЦ), послужили основанием для изучения индивидуальных вирусных

антигенов, моделирующих мембрану зараженных клеток. Оказалось, что выделенный и охарактеризованный мажорный неструктурный серотипоспецифический гликополипептид вируса АЧС с м.м. 110-140 кДа способен в неденатурированном виде в составе липосом индуцировать защиту животных от контрольного заражения в качестве протективного антигена. Результаты этого фрагмента работы позволяют сформулировать иммунологический алгоритм поиска протективных антигенов при вирусных инфекциях универсального значения [11, 12, 13].

Электронно-микроскопическое исследование взаимодействия вируса АЧС с клетками системы моноклеарных фагоцитов (критической мишени возбудителя в патогенезе инфекции) позволили установить апоптозный механизм клеточной гибели как новый противои инфекционный защитный феномен при данной болезни [6, 7].

Новизна результатов исследований заключается в том, что применительно к вирусу АЧС и вызываемой им инфекции получены принципиально новые научные данные. В частности, впервые количественно охарактеризована индукция ЦТЛ и эффекторов АЗКЦ, установлена корреляция их активности с иммунной защитой организма от вирулентного вируса, визуализированы опосредованные ими цитолитические эффекты, описано явление апоптоза клеток-мишеней вируса как нового защитного феномена. Показано значение мажорного неструктурного серотипоспецифического гликополипептида как протективного антигена при АЧС (способ его получения защищен авторским свидетельством № 322790.) Получены оригинальные данные по количественной характеристике субпопуляций Т-лимфоцитов, предложен новый методический прием для тестирования ЦТЛ в аутологичной системе мишень-эффектор. Комплексный подход в оценке иммуногенности компонентов вируса АЧС может служить универсальным иммунологическим алгоритмом поиска протективных антигенов при инфекциях различной природы. Полученные на модели АЧС данные о роли ЦТЛ в иммунной защите и ее индукции неструктурным вирусиндуцированным антигеном в сравнительном аспекте с оппозитной моделью подтверждают идею об асимметрии

эффекторного звена иммунного ответа, обосновывают необходимость идентификации ведущих элементов эффекторной системы организма и их индукторов-антигенов применительно к инфекциям и возбудителям различной природы.

Сопоставление результатов исследований с мировым уровнем свидетельствует о фундаментальности проблемы асимметрии эффекторного звена в противоинфекционном иммунитете. До сих пор при разработке вакцин и их иммунологической оценке используются эмпирические, наиболее удобные тесты, учитывающие лишь очевидные иммунные реакции, нередко далекие от явлений, обуславливающих истинную защиту организма. Полученные на модели АЧС данные показали, что критическую протективную роль могут играть малоизучаемые (в связи с относительной трудоемкостью тестирования) эффекторы, в частности ЦТЛ, и антигены, структурно не связанные с возбудителем, а ответственные за антигенную модуляцию мембраны клетки-хозяина. Поэтому сформулированная с учетом этих результатов концепция иммунологии внутриклеточного паразитизма [14] может иметь общее значение применительно к изысканию и конструированию вакцин.

Список публикаций по результатам исследований.

1. Новиков Б.В., Дмитриенко В.В. Власов Н.А., Макаров В.В. Выявление и количественная оценка субпопуляций Т-лимфоцитов свиней // С.-х. биология, 1995, № 2.
2. Середа А.Д., Соловкин С.Л., Сенечкина Е.К., Макаров В.В. Тестирование первичных вирусспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов свиней // С.-х. биология, 1994, № 6.
3. Селянинов Ю.О., Сенечкина Е.К. Физическое картирование генома вируса африканской чумы свиней // Доклады Россельхозакадемии, 1995, № 2.
4. Макаров В.В., Вишняков И.Ф., Коломыцев А.А., Середа А.Д. Сравнительный анализ важнейших показателей функциональной активности гуморального и клеточного иммунитета при вирусных инфекциях *in vivo* // Бюлл. эксп. биол. мед., 1995, № 12.

5. Makarov V.V., Vishnyakov I.F., Sereda A.D. What is the live vaccine dose? In: XXV World Veterinary Congress. 3-9 Sept. 1995, Yokohama, Japan.
6. Макаров В.В. Апоптоз в системе вирус африканской чумы свиней - моноклеарные фагоциты свиней // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1995, № 3.
7. Makarov V.V., Chevelyev S.F., Sereda A.D. Apoptosis of the macrophages for African swine fever. In: XXV World Veterinary Congress. 3-9 Sept. 1995, Yokohama, Japan.
8. Шубина Н.Г., Колонцов А.А., Малахова М.С., Макаров В.В. Межклеточные взаимодействия в культурах клеток костного мозга свиньи и ППК-66Б, зараженных вирусом африканской чумы свиней // Бюлл. эксп. биол. мед., 1996, № 10.
9. Makarov V.V., Perzashkevich V.S., Sereda A.D., Vlasov N.A., Kadetov V.V. Immunological evaluation of virus components and approaches to protection against viral challenge for African swine fever. In: Third Congress of the Eur. Soc. Vet. Virol., Interlaken, Switzerland, 4-7 Sept., 1994.
10. Макаров В.В., Перзашкевич В.С., Середина А.Д., Власов Н.А., Кадетов В.В. Иммунологический алгоритм поиска протективных антигенов при вирусных инфекциях // Вестник Россельхозакадемии, 1995, № 6.
11. Середина А.Д., Макаров В.В. Идентификация изолятоспецифического гликополипептида вируса африканской чумы свиней // Ветеринария, 1992, № 1.
12. Середина А.Д., Анохина Е.Г., Фугина Л.Г., Макаров В.В. Серологические и физико-химические свойства ГП 110-140 вируса африканской чумы свиней // Ветеринария, 1993, № 1.
13. Анохина Е.Г., Середина А.Д., Митин Н.И., Макаров В.В. Антигенное различие изолятов вируса африканской чумы свиней в пределах одного серотипа по данным количественной радиоиммунопреципитации // Акт. попр. вет. вирусол. Мат. научно-практ. конф. ВНИИВВиМ. Покров, 1995.
14. Макаров В.В., Бакулов И.А., Семенихин А.Л., Филиппов В.В. Внутриклеточный паразитизм и протективный иммунитет // Вестник Россельхозакадемии, 1994, № 3.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ПАРАЗИТИЗМ И ПРОТЕКТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ*

Вакцинопрофилактика служит надежным способом управления важнейшими эпизоотическими инфекциями (ящур, бешенство, болезни Ньюкасла и Ауески). Однако складывается определенная группа болезней, где типичен следующий закономерный комплекс:

- § *вакцины из убитого корпускулярного возбудителя неэффективны в защитном плане;*
- § *отсутствует нейтрализация возбудителя гуморальными антителами или, по крайней мере, нет коррелятивной связи между показателями гуморального иммунитета и иммунным состоянием организма;*
- § *иммунная защита вместе с тем возможна с помощью препаратов из антигенов, которые образуются при размножении возбудителя;*
- § *защита модифицированными вариантами живого возбудителя также возможна, но не за счет вакцинального процесса с известными требованиями к нему, а как результат персистенции и «хронического» присутствия модифицированного возбудителя в организме (нестерильный иммунитет).*

В качестве примеров можно привести бактериозы - туберкулез, листериоз, протозойные инфекции - малярию, тейлериоз, вирозы - африканскую чуму свиней, геморрагические лихорадки.

Разработкой средств специфической профилактики занято большое число как научных работников, так и НИУ. Имеется богатейший экспериментальный материал частного значения. Однако крайне недостаточно синтетических работ, определяющих иммунологическую и паразитологическую стратегию исследований. Помимо трудоемких экспериментов, несомненно, необходимы общетеоретические, гипотетико-дедуктивные подходы, которые можно назвать, используя образное выражение В.М. Жданова, как «взгляд издали» [4].

* опубликована в журнале «Вестник Россельхозакадемии», 1994, 3, 45-49 совместно с И.А.Бакуловым, А.Л.Семенихиным и В.В.Филипповым.
Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 94-04-12076.

Паразитизм и патогенность.

В таблице 1 представлены систематизированная ситуация относительно паразитизма живых патогенов, их уровни, типы, представители*. Очевидна правомерность тезиса о том, что далеко не все патогенные организмы - паразиты в истинном, экологическом смысле. Формируются большие, не имеющие преемственной связи группы организмов, патогенность которых реализуется за счет других возбудителей-паразитов (оппортунистические инфекции и микозы) или в условиях случайного и факультативного паразитизма их метаболиты оказываются токсичными для хозяина. Вызываемые ими болезни не способны к эпизоотическому распространению, заболеваемость, как правило, спорадична и энзоотична. В этом смысле им противопоставляются возбудители паразитозов - первичные, облигатные патогены и облигатные паразиты.

Паразитизм - явление экологическое, и его принято рассматривать с позиций межпопуляционных взаимодействий двух видов в рамках паразитарной системы. Очевидно, что возбудители сапронозов не соответствуют требованиям биосистемного функционирования. Однако как облигатные, так и прочие патогены инвазируют организм хозяина, и при этом также имеются вполне определенные закономерности, в частности, относительно их дальнейшего существования - в условиях циркулирующих систем, в межклеточных пространствах или внутри клеток.

В таблице 2 приведены характеристика явления внутриклеточного паразитизма патогенов и распространение феномена. Оказывается, что патогены разных систематических групп с различной физиологией (от простейших до вирусов) реализуют свой биологический потенциал именно на этом уровне. Более того, считается, что внутриклеточная среда в условиях организма является основным местом развития инфекционных процессов, вызываемых живыми патогенами [10]. Причем это

* исходя из контекста, мы ограничиваемся одноклеточными организмами и не рассматриваем многоклеточных - гельминтов, а также полостных, неинвазирующих паразитов типа *Amoeba* и *Trichomonas*, поскольку их взаимодействие с иммунной системой не дает протективных эффектов в тривиальном понимании.

Таблица 1.

Уровни паразитизма	Потребности паразита (по нарастающей)	ПАТОГЕНЫ					
		Опportunистические	Факультативные	Облигатные			
		Возбудители сапронозов			Возбудители паразитозов (зоонозов)		
		Сапрофиты или фито-паразиты	Сапрофиты или случайные паразиты	Факультативные паразиты	Облигатные паразиты		
					Внеклеточные	Внутриклеточные	
						Факультативные	Облигатные
Метаболический	N, C, источник энергии	<i>Candida</i> Кокциди-оиды <i>Aspergillus</i>	Псевдомонады Легионеллы	Вибрионы Иерсинии	-	-	-
	Аминокислоты, азотистые основания		Протей Гистоплазмы Криптококки Бластомицеты	<i>Bac. anthracis</i> Лептоспиры <i>Erisipelothrix</i> Клостридии	Дерматофиты Стафилококки	-	-
	Сложные, метаболически активные молекулы	-	-	Листерии	Трипаносомы Стрептококки Кориневые бактерии Микоплазмы	Бруцеллы Микобактерии Пастереллы Франсиселлы	Плазмодии Кокцидии Лейшмании Тейлерии Риккетсии
Энергетический	АТФ, НАД, кофермент А	-	-	-	-	-	Хламидии
Генетический	Условия живых клеток	-	-	-	-	-	Вирусы

Таблица 2.

Паразиты		Клетки-хозяева паразита	Нозология
Систематические группы	Типы, виды		
ЭУКАРИОТЫ:			
Простейшие	Токсоплазмы Трипаномы Лейшмании Тейлери Плазмодии	Макрофаги и другие типы клеток Макрофаги Макрофаги Лимфоциты Макрофаги печени, эритроциты	Зоонозные протозойные инфекции
Грибы	Дрожжи Кокцидиоиды Гистоплазмы Криптококки	Макрофаги Макрофаги Макрофаги Макрофаги	Сапронозные микозы
Эубактерии	Бруцеллы Пастереллы Франсиселлы Микобактерии Шигеллы Сальмонеллы Легионеллы Листерии	Макрофаги Макрофаги Макрофаги Макрофаги Энтероциты, макрофаги Энтероциты, макрофаги Макрофаги Макрофаги	Зоонозные инфекции
Микоплазмы	Все виды	Разные типы клеток	Зоонозные инфекции
Риккетсии	Все виды	Разные типы клеток	
Хламидии	Все виды	Разные типы клеток	
Вирусы	Все виды	Разные типы клеток	
ПРОКАРИОТЫ:			
Бактерии	Бделловибрионы	Бактерии	Инфекции бактерий

относится не только к облигатным внутриклеточным паразитам - вирусам, хламидиям, риккетсиям, некоторым *Protozoa*, но и большинству патогенных бактерий. Клеточные элементы системы мононуклеарных фагоцитов Ван Ферта, в силу особенностей своего функционирования и роли в физиологии организма являющиеся первым защитным рубежом, служат клеткой-хозяином в большинстве случаев внутриклеточного паразитизма. Эту роль могут выполнять и другие клеточные элементы эу- и даже прокариотической принадлежности. Популяции чувствительных клеток и микропопуляции живых патогенов реализуют важнейшие события в функционировании паразитарных систем не на экологическом (эпизоотический процесс), а на патогенетическом (инфекционный процесс) уровне, поэтому феномен внутриклеточного паразитизма в данном случае включает и непаразитические патогенные организмы.

Таким образом в условиях организма формируется своеобразная паразитарная микросистема (или подсистема), а характер патологии в этом случае определяется интересами этой биосистемы. Степень патогенности возбудителей и тяжесть течения болезней могут быть самыми разнообразными - от латенции патогена до сверхострых и фатальных исходов [1]. С другой стороны, для внеклеточных паразитов патология, как правило, не является клинически (или топически) типичной, а характеризуется сепсисом, гранулемами, абсцессами, что определяется особенностями взаимодействия возбудителей с организмом хозяина и реакциями на их инвазию и размножение, в основном, воспалительного, то есть общего, порядка. Такие явления обычны для межвидовых взаимодействий типа хозяин-необлигатный паразит, или вообще не паразитический, но патогенный организм.

Комплекс *клетка-паразит*.

Внутри клеток паразит существует в экстремальных условиях (по Moulder [13]). Здесь ограничено разнообразие сообитающих видов, то есть паразит живет в практически чистой культуре, развиваются новые, приспособительные свойства, которых нет у других организмов. Развитие этих приспособлений зависит от лимитирующих факторов экстремальных условий, а лимитирующие факторы являются абиотическими.

Вместе с тем внутриклеточная среда представляет исключительные выгоды для биологии паразита:

- § обеспечивает метаболические, энергетические и генетические потребности (см. таблицу 1);
- § предохраняет от действия защитных механизмов организма и различного рода неблагоприятных факторов (фагоцитоза, антител, бактериофагов, антибиотиков);
- § обуславливает особый (упрощенный) цикл развития, в частности, для облигатных внутриклеточных патогенов (типичный пример - диморфные грибы).

Именно этим объясняются два первых момента приведенного в начале комплекса закономерностей. Паразит, персистирующий внутри клетки, недоступен для нейтрализации и прочего влияния иммунологических факторов, которые могут быть индуцированы им самим в корпускулярном виде.

Если рассматривать всю совокупность условий внутриклеточного паразитизма с эволюционно-экологических позиций, несомненно, наибольшее значение приобретает комплекс *клетка-паразит**. Этот комплекс в соответствии со всеми закономерностями общей паразитологии представляет собой заполненную экологическую микронишу, функционирующую во времени и пространстве. В принципе в жизненных интересах паразита - длительное существование такого комплекса, что и наблюдается в условиях персистентного течения болезней. Паразит меньше всего заинтересован в разрушении целостности клетки-хозяина и делает это только с целью ее смены. В пространстве, то есть в условиях определенных тканевых и органных систем организма, именно комплекс *клетка-паразит*, а не просто паразит *per se*, взаимодействует с окружением, с защитными механизмами и факторами прежде всего иммунологического порядка. Таким образом, этот комплекс оказывается в центре всех явлений патобиоза, обусловленных внутриклеточным паразитом, включая иммунный ответ организма.

* по аналогии с понятием, введенным R. Dulbecco (1965) для комплекса *вирус-клетка*.

Иммунология внутриклеточного паразитизма.

Комплекс *клетка-паразит*, несомненно, будет обладать своеобразными свойствами, в числе которых наиболее важны те, что определяют упомянутое взаимодействие с окружением. Несмотря на отсутствие достаточных научных фактов обобщающего характера*, об этом свидетельствуют данные о мембранных антигенах при репродукции вирусов [7], а также проявление ГЗТ при болезнях, вызываемых подавляющим большинством перечисленных в таблице 2 внутриклеточных патогенов [2, 5]. Антигенная модуляция клетки, несущей паразита, точнее модуляция мембраны зараженной клетки антигенами паразита, делает комплекс участником иммунологических реакций, и не только в условиях организма; существуют многочисленные тесты для подтверждения и оценки феномена *in vitro* [5].

Взаимодействие комплекса *клетка-паразит* с элементами иммунной системы, где в качестве материальных носителей выступают антигены паразита, экспрессированные в клеточных мембранах, и иммунологические эффекторы, имеет огромное эволюционное значение в биологии паразита и подчиняется правилам взаимодействия популяций *жертва-хищник* согласно уравнению Лотки-Вольтерра. Для вирусных инфекций явление описано нами ранее [8]. Эти пока чисто теоретические посылки в дальнейшем могут послужить основой для объяснения второй части приведенного в начале комплекса закономерностей.

В связи с этим представляется интересным рассмотреть возможности эффекторного звена иммунной системы. В таблице 3 показаны системы, компоненты и реакции. Оказывается, что эффекторный репертуар достаточно конкретен и ограничен: *пять* эффекторных систем с помощью *десяти* эффекторов обуславливают *четыре* стереотипные реакции, обезвреживающие патогенные элементы. В их числе только в одной реакции – цитолизе с участием цитотоксических Т-лимфоцитов-киллеров

* известное исключение составляет старая книга Дж. Моулдера «Биохимия внутриклеточного паразитизма» (М.: Мир, 1965), однако в ней не рассматриваются иммунологические аспекты и не ставится вопрос о новых, эмергентных свойствах клеток, содержащих паразитов.

Таблица 3.

Эффектор- ные системы	Эффекторы (действующее начало, структурные компоненты)	Реакции с участием эффекторов	Обезвреживаемые агенты
1. Клеточ- ный иммунитет	Лимфоциты: • Т-лимфоциты-киллеры (1) • естественные киллеры (2) • <i>0</i>-, <i>K</i>-, <i>L</i>-лимфоциты (3) Лимфокины (4)	Антигенспецифические взаимодействия с клетками-мишенями: • прямой цитоллиз (1) • прямой цитоллиз (1) • антителозависимый цитоллиз (1) Неспецифические эффекты: • активация фагоцитоза (2)	• зараженные клетки • зараженные клетки • зараженные клетки • бактерии
2. Гумо- ральный иммунитет	IgG, IgM: • <i>Fab</i> - фрагмент (5) • <i>Fab+Fc</i> - фрагменты (6) • <i>Fc</i> - фрагмент (6)	Взаимодействие с антигенами: • прямая нейтрализация (3) • опсонизация фагоцитоза (2) • активация комплемента с образованием МАК* (4)	• вирусы, токсины • бактерии, вирусы • клетки, бактерии, вирусы

Продолжение таблицы 3.

3. Секреторный иммунитет	<i>IgA - Fab</i>-фрагмент (5)	Нейтрализация (3)	Вирусы, бактерии
4. Система мононуклеарных фагоцитов	Бактерицидные факторы, гидролазы (7)	Фагоцитоз (2), в т.ч. активированный лимфокинами и опсонинами	Бактерии, вирусы
5. Комплемент	<i>C1 - C3</i> (8) <i>C1 - C4</i> (9) <i>C5</i> - поли-<i>C9</i> (<i>C9</i>₁₂) (МАК*) (10)	Опсонизация фагоцитоза (2) Прямая нейтрализация (3) Комплементзависимый лизис биомембран (4)	Бактерии Вирусы Клетки, бактерии, вирусы

* МАК - мембраноатакующий комплекс.

(ЦТЛ) - потенциально способны обезвреживаться структуры клеточного уровня организации. Поэтому, не вдаваясь в детальный фактологический анализ, можно отметить ряд общих моментов.

Во-первых, при всех патологических явлениях (микозах, инфекциях, включая протозойные) установлены и легко воспроизводятся прототипные реакции клеточного иммунитета, в частности ГЗТ [2, 5]. Уже одно это свидетельствует об антигенной модуляции мембран клеток, несущих паразитов, и участии последних во взаимодействиях с компонентами иммунной системы. *Во-вторых*, клеточный уровень эффекторных реакций против зараженных клеток, в отличие от молекулярного уровня реакций гуморального иммунитета с участием антител и компонентов системы комплемента, предусматривает своеобразный стереотипный иммуногенез. *В-третьих*, в этом стереотипе «задействованы» такие обязательные элементы и механизмы, как:

- § *антигены возбудителя, экспрессированные в мембране клетки;*
- § *ЦТЛ и асимметричное развитие эффекторного звена протективного иммунитета с их ведущей ролью;*
- § *интерлейкин-2 - медиатор, активирующий ЦТЛ;*
- § *антигены главного комплекса гистосовместимости, обуславливающие аллогенную рестрикцию действия ЦТЛ;*
- § *живая, цельная клетка-хозяин паразита как носитель антигенности, индуктор и объект иммунологической атаки (обезвреживаемый элемент).*

Прикладной аспект теории.

Для перечисленных в таблицах 1 и 2 представителей в большинстве случаев неизвестны протективные антигены, а полученные «вакцинные» препараты иммунологически не охарактеризованы в необходимой степени и в лучшем случае оценены лишь по максимально «укрупненному» показателю - защите от клинического проявления болезни. Многим присущ перечисленный в начале комплекс закономерностей. Наиболее типичный пример - последние данные по противостерийной вакцине из штамма АУФ [3]. (Исключение могут составлять анатоксины или вакцины, эффективность которых ориентированна

на антитоксический иммунитет гуморального типа или иной нейтрализующий иммунный ответ).

Вместе с тем несомненно, что внутриклеточный паразитизм должен обуславливать общность иммунного ответа по упомянутому стереотипу. И в самом деле, оказывается, что совершенно независимые таксономически и далекие представители индуцируют удивительно сходный иммуногенез, что может быть обусловлено только иммунологическими особенностями функционирования их в составе комплексов *клетка-паразит*. Существуют два весьма убедительных примера, иллюстрирующих ситуацию.

Во-первых, сотрудниками лаборатории биохимии ВНИИВВиМ при изучении иммунологии африканской чумы свиней показано наличие всех пяти упомянутых выше важнейших элементов и механизмов развития противоклеточного иммунитета при данной инфекции вирусной этиологии. Однозначно определена клетка-мишень вируса - макрофаг. Выделен и охарактеризован мембранный вирусный гликопротеин ГП 110-140, который обладает изолято(серотипо)специфическими свойствами и предполагается в качестве кандидата в протективные антигены [6, 9, 11].

Во-вторых, исследовательской группой W.Morrison в целях изыскания вакцин против тейлериоза установлены абсолютно те же элементы и механизмы противоклеточной защиты. В качестве клеток-мишеней *Theileria parva* постулированы лимфоциты *CD4* (хелперы), показан опосредованный моноклональными антителами лизис зараженных лимфобластоидных клеток *in vitro*, получена индукция иммунитета против *T. parva* плазматическими мембранами инвазированных лимфоцитов, выделен и охарактеризован поверхностный антиген спорозоида - гликопротеин *gp 67*, также предполагаемый кандидат в протективные антигены [12]. В обоих случаях, как для вируса африканской чумы свиней, так и для возбудителя протозойной инфекции, пригодны мембранные гликопротеины в качестве субъединичных вакцин или антигенов рекомбинантных вакцин в составе про- и эукариотических векторов.

С учетом изложенного общие подходы могут быть применены к иммунологии многих паразитозов. Становится возможной

концептуальная, а затем и экспериментальная разработка проблемы иммунологии внутриклеточного паразитизма прежде всего с практической целью создания научно обоснованных принципов их вакцинопрофилактики. Несомненно, это будет полезно также с точки зрения стратегии создания вакцин с использованием возможностей современной биотехнологии.

Литература.

1. Бакулов И.А., Макаров В.В. // Вестник с.-х. науки. 1990, № 7.
2. Беклемешев Н.Д. Иммунопатология и иммунорегуляция. М., Медицина, 1986.
3. Белоусов В.Е., Котляров В.М., Маничев А.А. и др. // Медико-ветеринарные аспекты листериоза. Тез. докл. научно-произв. конф., Покров, 1993.
4. Жданов В.М., Львов Д.К. Эволюция возбудителей инфекционных болезней. М., Медицина, 1984.
5. Иммунологические аспекты инфекционных заболеваний. Под ред. Дж. Дика. М., Медицина, 1982.
6. Колонцов А.А. Макаров В.В. // С.-х. биология. 1993, № 4.
7. Макаров В.В. // Вопросы вет. вирусол., микробиол., эпизоотол. Тез. докл. научн. конф., Покров, 1983.
8. Макаров В.В. // Проблемы вет. имунол. М., 1985.
9. Макаров В.В., Малахова М.С., Власов Н.А. и др. // Доклады Россельхозакадемии, 1992, № 11-12.
10. Петровская В.Г. Проблемы вирулентности бактерий. М., Медицина, 1967.
11. Середа А.Д., Макаров В.В. // Ветеринария. 1992, № 1.
12. McKeever D., Morrison W. // Rev. Sci. Tec. Off. Int. Epizoot., 1990, 9, № 2.
13. Moulder J. // J. Infect. Dis., 1974, 130, № 3.