

УДК 576.8.093.3:612.017.1:615.076.9

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АВТОКЛАВИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ С КЛЕТКАМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Плескановская С.А., Семина И.Ф., Довлетов Д., Аннабердыева М.К.

Туркменский государственный медицинский университет им. М. Гаррыева, Ашхабад, e-mail: pleskanovskaya_s@mail.ru

Целью настоящей работы являлось изучение влияния автоклавированной культуры стафилококка (*Staphylococcus aureus*), стрептококка (*Streptococcus piogenes*) и их лизатов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток крови мышей *in vivo* и *in vitro*. Мышам линии BALB/c внутривенно вводили равные объемы 0,9% раствора хлорида натрия, автоклавированной культуры стафилококка (*Staphylococcus aureus*) и стрептококка (*Streptococcus piogenes*). О характере реакции лейкоцитов мышей на введение автоклавированной культуры бактерий *in vivo* и *in vitro* судили по результатам реакции торможения миграции лейкоцитов. В качестве индуктора миграции использовали лизат этих же культур бактерий. Результаты выражали в виде индекса миграции лейкоцитов. Одновременно определяли величину гранулоцитарного индекса. Исследование показало, что лизаты культуры стафилококка и стрептококка *in vitro* модулируют миграцию лейкоцитов интактных мышей из стеклянного капилляра. У мышей, получивших внутривенно инъекции автоклавированной культуры стафилококка и стрептококка, величина индекса миграции лейкоцитов и гранулоцитарный индекс прогрессивно снижались в течение 21 дня. Сделан вывод, что в периферической крови здоровых интактных мышей циркулируют лимфоциты, специфически sensibilized к антигенам бактерий. Определение величины индекса миграции лейкоцитов и гранулоцитарного индекса у животных, иммунизированных автоклавированной культурой бактерий, перспективно в плане разработки объективного и доступного критерия оценки фоновой антибактериальной активности иммунной системы и напряженности антибактериального иммунитета млекопитающих.

Ключевые слова: автоклавированные культуры *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus piogenes*, миграция лейкоцитов.

INTERACTION OF AN AUTOCLAVED CULTURE OF GRAM-POSITIVE BACTERIAS WITH IMMUNE SYSTEM' CELLS *IN VIVO* AND *IN VITRO*

Pleskanovskaya S.A., Semina I.F., Dovletov D., Annaberdyeva M.K.

Turkmen State Medical University named after M. Garryev, Ashhabad, e-mail: pleskanovskaya_s@mail.ru

The purpose of this work was to study the effect of autoclaved culture of grampositive bacteria's *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus piogenes* and their lysates on the mice immunocompetent cells' functional activity *in vivo* and *in vitro*. BALB/c mice were intraperitoneally injected with equal volumes of 0.9% sodium chloride solution, autoclaved culture of staphylococcus (*Staphylococcus aureus*) and streptococcus (*Streptococcus piogenes*). The character of the mouse leukocytes' reaction to the introduction of autoclaved bacteria' culture *in vivo* and *in vitro* was judged by the results of the leukocyte migration inhibition reaction. The lysate of the same bacterias (*Staphylococcus aureus*) and (*Streptococcus piogenes*) respectively was used as a migration inducer. The results were expressed as leukocyte migration index. At the same time, the granulocytary index value was determined. The study showed that lysates of staphylococcus and streptococcus *in vitro* modulates the intact mice leukocytes' migration from a glass capillary. The leukocyte migration index and granulocytary indexes value progressively decreased over 21 day in the staphylococcus and streptococcus injections received mice. It was concluded that there are specifically sensitized to bacterial antigens lymphocytes in the healthy intact mice blood' circulation. Determining the value of leukocyte migration index and granulocyte index in animals immunized with an autoclaved bacterial cultures is promising in terms of developing an objective and accessible criterion for assessing the background antibacterial activity of the immune system and the intensity of the antibacterial immunity of mammals.

Keywords: autoclaved cultures, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus piogenes*, leukocyte migration.

Биологическая безопасность определяется наличием правил проведения диагностических, производственных или экспериментальных работ с патогенными

биологическими агентами, а также при производстве вакцин против инфекционных заболеваний [1]. Изучение взаимодействий человеческого организма и возбудителей инфекционных болезней на клеточном и молекулярном уровнях выходит в ряд первоочередных задач человечества. Именно в этой области развития мировой науки эксперты-футурологи ожидают существенного прорыва уже в первой половине XXI века. Базируясь на получаемых иммунологами и микробиологами сведениях молекулярно-биологического уровня, медицина находит все больше возможностей для решения ранее, казалось бы, неразрешимых проблем практического характера [2]. Известно, что иммунная система отвечает не на всю клетку возбудителя, а на отдельные антигены. В этой связи необходимо найти наиболее важные для создания иммунитета компоненты бактерий [3; 4].

Защита микроорганизма от бактериальной атаки складывается из последовательного включения в борьбу с возбудителем факторов естественной резистентности и специфического иммунного ответа [5]. Возбудитель (бактериальная клетка) распознается в первую очередь факторами врожденного и затем только адаптивного (антигенспецифического) иммунитета [6; 7]. Тем не менее бактерии нередко выживают в условиях функциональной активности макроорганизма, ускользают от реакций как врожденного, так и адаптивного иммунитета, персистируют в макроорганизме, что приводит к развитию хронического воспалительного процесса [8-10]. Понимание механизмов, с помощью которых патогенные бактерии выживают в тканях и органах хозяина, поможет глубже понять сложные взаимодействия между патогенными бактериями и иммунной системой. Более того, позволит понять сложную тактику уклонения патогена от реакции иммунной системы, разработать новые стратегии борьбы с ними, новые вакцины, которые будут направлены на защиту от новых бактериальных заболеваний, имеющих важное значение для общественного здравоохранения [7; 11].

Следует отметить, что все находки, полученные при изучении механизмов взаимодействия в системе «бактерия - иммунная система макроорганизма», сделаны в системе *in vivo* [2; 7; 8; 12]. Перекрестная реакция макроорганизма на убитые культуры стафилококка и стрептококка остается вообще малоизученной. Для более полного понимания механизмов функционирования иммунной системы и ее взаимодействия с бактериями построены математические модели, но прогностическая ценность таких моделей пока незначительна [13].

Целью настоящей работы являлось исследование характера влияния автоклавированной культуры стафилококка (*Staphylococcus aureus*) или стрептококка (*Streptococcus pyogenes*) и их лизатов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток крови мышей *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 30 мышах линии BALB/c. Мыши-самцы массой не менее 20 г получены из питомника Центра технологий Академии наук

Туркменистана. Было выделено 3 группы животных по 10 в каждой. Мышам первой группы внутрибрюшинно вводили 0,5 мл стерильного 0,9% раствора хлорида натрия (NaCl), мышам второй – по 0,5 мл автоклавированной культуры *Staphylococcus aureus* (АК СТФ), мышам третьей – 0,5 мл автоклавированной культуры *Streptococcus piogenes* (АК СТР). Культуры бактерий получены из музея штаммов кафедры микробиологии Государственного медицинского университета Туркменистана им. М. Гаррыева. Перед введением животным суточную культуру бактерий, содержащую в 1 мл рабочей взвеси 5×10^9 микробных тел (по стандарту мутности), автоклавировали в течение 45 минут при 1,5 атм.

О характере реакции организма животных на введение автоклавированной культуры бактерий *in vivo* и *in vitro* судили по результатам реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) в модификации [14]. Результаты выражали в виде индекса миграции лейкоцитов (ИМЛ). В качестве индуктора миграции использовали лизат той же культуры бактерий, которую вводили животным – ЛЗстр и ЛЗстф соответственно. Лизат получали пятикратным замораживанием-оттаиванием культуры с последующим центрифугированием в течение 30 минут при 3000 об./мин. Надосадочную жидкость пропускали через фильтровальную бумагу. Полученный фильтрат автоклавировали в течение 45 минут при 1,5 атм. Лизат хранили при -19°C не более 1 месяца. Одновременно у животных всех групп определяли величину гранулоцитарного индекса (ГИ) – отношение суммы циркулирующих полинуклеаров к сумме мононуклеаров [15]. Животных обследовали до внутрибрюшинного введения культуры и на 3, 7, 14 и 21-е сутки после введения АКстф и АКстр. Полученные данные математически обработаны при помощи программы SPSS (USA).

Результаты исследования и их обсуждение. Исследование показало, что введение ЛЗстф и ЛЗстр в среду культивирования капилляров с кровью интактных мышей стимулирует миграцию лейкоцитов (табл. 1). Как видно из таблицы, ИМЛ интактных мышей в присутствии ЛЗстр и ЛЗстф практически не различается ($p > 0,05$). Величина ГИ у животных до введения АК бактерий соответствует норме у данной линии животных. После внутрибрюшинного введения мышам АКстф величины ИМЛ и ГИ существенно изменяются. Уже на 3-и сутки ИМЛ в присутствии *in vitro* лизата одноименной культуры (ЛЗстф) снижается в 1,9 раза ($p < 0,01$) по отношению к исходному уровню.

Таблица 1

ИМЛ и ГИ мышей, получивших АК стф, в зависимости от индуктора реакции

Время обследования	ИМЛ в зависимости от группы и индуктора миграции			ГИ В/б АКстаф
	Контрольная (+ЛЗ стф in vitro)	В/б АКстаф (+ЛЗ стф in vitro)	В/б АКстаф (+ЛЗ стр in vitro)	
До в/б введения АКстф	130,6±10,7	125,5±7,9	127,9 ±10	1,3±0,08

3 сут.	125,7±10,0	65,3±4,9**	77,6±3,7*	0,47±0,01**
7 сут.	110,5±3,8	67,1±3,8**	82,5±5,1*	1,08±0,02*
14 сут.	115,9±4,2	72,7±6,7*	54±3,8**	0,56±0,01**
21 сут.	133±7,2	57,3±3,3**	62,6±4,1**	0,35±0,02**

Примечание. Здесь и далее: P – статистически значимые изменения между данными до введения лизата и в динамике исследования: * – P < 0,05; ** – P < 0,01.

В присутствии ЛЗстр *in vitro* ИМЛ снизился в меньшей степени – в 1,74 раза, различие по отношению к исходному уровню (p<0,01). У мышей, получивших АКстф, величина ИМЛ в присутствии как ЛЗстф, так и ЛЗстр продолжала снижаться на протяжении всего периода наблюдения (21 сутки) (рис. 1А).

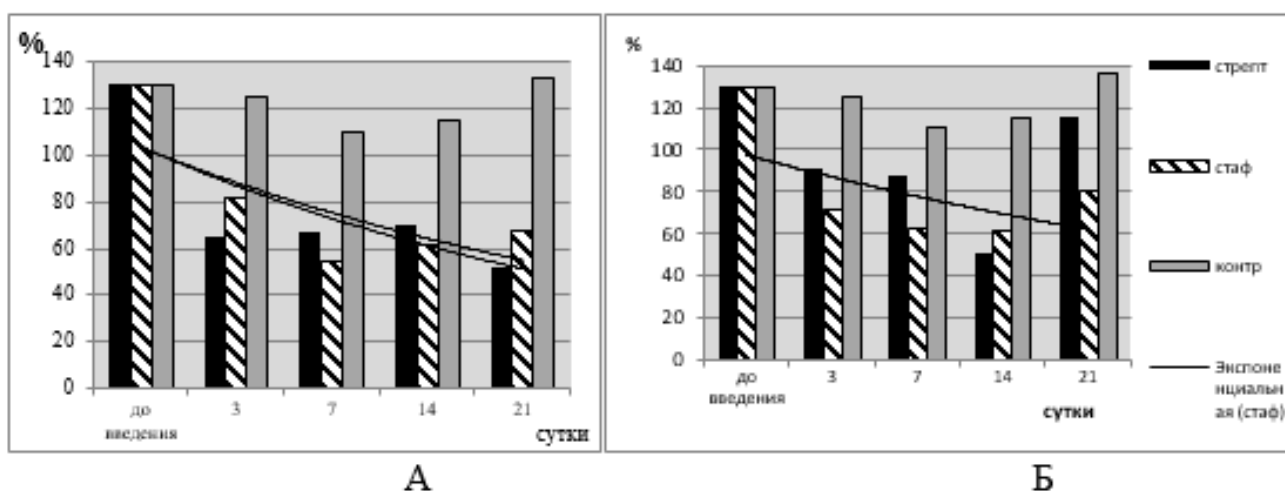


Рис. 1. Величина ИМЛ в динамике ответа на введение АКстф (А) и АКстр (Б)

К 21 суткам значение ИМЛ в присутствии ЛЗстф и ЛЗстр составляет 46,5% и 48,8% от исходного уровня соответственно. Линия тренда на графике показывает, что независимо от вида индуктора выражена тенденция к снижению значения ИМЛ в течение 21 суток (рис. 1Б).

При внутрибрюшинном введении мышам АКстр наблюдаются те же изменения величины ИМЛ, что и в предыдущей серии экспериментов (табл. 2, рис. 1 А, Б).

Таблица 2

ИМЛ мышей, получивших АК стр, в зависимости от индуктора реакции

Время обследования	ИМЛ в зависимости от группы и индуктора миграции			ГИ В/б АКстр
	Контрольная (+ЛЗ стр <i>in vitro</i>)	В/б АКстр (+ЛЗ стр <i>in vitro</i>)	В/б АКстр (+ЛЗ стф <i>in vitro</i>)	
До введения АК стр	120,6±8,9	111,7± 8,2	115,3±7,6	1,3±0,07
3 сут.	129,7±8,0	71,0±4,7*	91,3±6,2	1,8±0,02**
7 сут.	111,5±7,5	63,5±5,1*	88,6±5,8	1,1±0,04*

14 сут.	115,9±6,2	61,0±4,1**	51,2±4,7	0,73±0,07**
21 сут.	135±9,2	80,7±6,6*	116,0±7,3	0,4±0,09**

Величина ИМЛ прогрессивно снижается и особенно значительно на 7-14-е сутки после инъекции. На 21-е сутки она несколько увеличивается, но остается ниже исходной ($p < 0,05$). Любопытно, что ЛЗстф *in vitro* тоже тормозит миграцию лейкоцитов мышей, получивших АКстр, но в меньшей степени (рис. 1). На 21-е сутки в присутствии ЛЗстф значение ИМЛ соответствует исходному уровню (табл. 2). Таким образом, лейкоциты мышей, получивших *in vivo* АКстф, *in vitro* реагируют на присутствие как ЛЗстф, так и на ЛЗстр, но в большей степени реагируют на ЛЗ «знакомых» бактерий. Значит ли это, что АКстф и АКстр имеют общие термостабильные антигены, покажут дальнейшие исследования. Динамика значений ГИ в этой группе отличается от таковой у животных, получивших инъекции АКстф.

Гранулоциты – одна из самых активных субпопуляций лейкоцитов, контролирующих гомеостаз организма [10; 11]. Гранулоцитарный индекс – отношение суммы циркулирующих полинуклеаров к сумме мононуклеаров - четко характеризует реакцию организма на вторжение патогена. Настоящее исследование включало определение величины ГИ в динамике ответа животных на введение автоклавированной культуры бактерий (табл. 1 и 2). Были выявлены довольно существенные различия в зависимости от вида возбудителя (рис. 2).

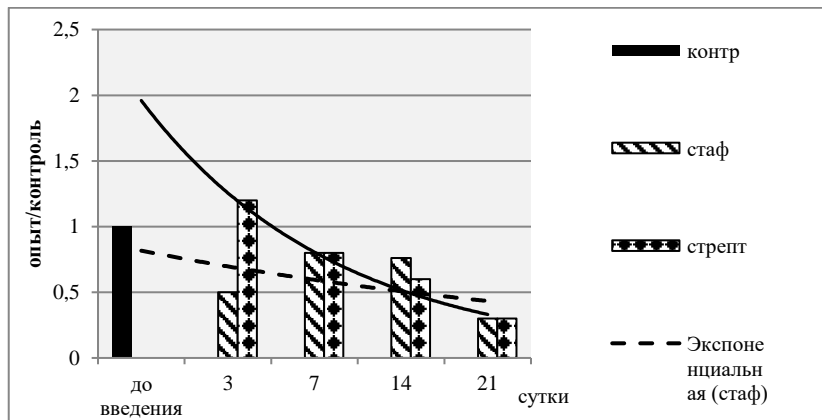


Рис. 2. Степень изменения по отношению к контролю величины гранулоцитарного индекса в зависимости от группы животных. За 1 принят уровень контроля

На диаграмме хорошо видно, что в группе мышей, получивших АКстф, на 3-и сутки величина ГИ резко снижается ($p < 0,01$ против исходного уровня). В дальнейшем – на 7-е и 14-е сутки она достоверно увеличивается ($p < 0,01$) и снова довольно резко снижается к 21-м суткам ($p < 0,01$). В группе мышей, получивших АКстр, величина ГИ на 3-и сутки достоверно увеличивается ($p < 0,01$), затем прогрессивно снижается и на 21-е сутки становится в 3,25 раза ниже исходной, но соответствует таковой в группе животных, получивших АКстф ($p > 0,05$).

Линии тренда на диаграмме иллюстрируют различия, но в целом свидетельствуют о тенденции к снижению величины ГИ в обеих группах.

По всей видимости, автоклавированные бактерии сохраняют ряд термостабильных поверхностных антигенов. Во всяком случае, высокое значение ИМЛ в группе интактных мышей в присутствии ЛЗстф и ЛЗстр *in vitro* свидетельствует о циркуляции в их периферической крови лейкоцитов, специфически сенсibilизированных к антигенам бактерий. По всей видимости, снижение величины ИМЛ после внутрибрюшинного введения животным АКстф и АКстр связано со снижением активности системы распознавания антигена и началом процесса формирования иммунного ответа в организме животных. Создается впечатление, что величина ИМЛ в присутствии ЛЗ бактерий *in vitro* соответствует двум основным фазам иммунного ответа *in vivo*: фазе распознавания (высокий ИМЛ) и фазе адаптивного иммунитета в виде формирования специфических антител или сенсibilизированных лейкоцитов (низкий ИМЛ). Таким образом, в результате введения животным автоклавированной культуры бактерий формируется специфический иммунный ответ, то есть имеет место процесс иммунизации организма к определенным термостабильным антигенам стафилококков и стрептококков.

Прошло уже более 100 лет с момента проведения первой вакцинации для индукции полноценного иммунного ответа и защиты макроорганизма от инфекции. Было доказано, что иммунитет основан на реакции организма на бактериальный антиген. Далее была доказана роль иммунной системы в реакции на антиген и создании иммунитета к инфекционному агенту. Но главное значение имеет антиген, на который иммунная система реагирует формированием либо антител, либо цитотоксических лимфоцитов.

Для более полного понимания механизмов функционирования иммунной системы и ее взаимодействия с бактериями построены математические модели. Прогностическая ценность таких моделей пока незначительна. Следовательно, остается актуальным поиск адекватных моделей функционирования системы «иммунная система - бактерия».

Несмотря на общее происхождение антимикробной и иммунологической науки, создание в микробиологии определенных парадигм наложило ограничения на иммунологический аспект понимания механизмов взаимодействия бактерии и макроорганизма. Это привело к тому, что эти механизмы исследуются и понимаются только *in vivo*.

Заключение. Настоящее исследование в известной степени позволило объединить изучение взаимодействия бактерий и макроорганизма *in vivo* и *in vitro*. Определение величины ИМЛ и ГИ у иммунизированных животных является перспективным в плане разработки объективного и доступного критерия оценки *in vitro* фоновой антибактериальной активности

иммунной системы и определения динамики формирования специфического иммунного ответа животных и человека на бактериальный антиген *in vivo*.

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Концептуальные основы биологической безопасности // Часть I. Вестник РАМН. 2013. Т. 68. № 10. DOI: 10.15690/vramn.v68i10.781.
2. Песнякевич А.Г. Медицинская и санитарная микробиология: учебно-методический комплекс. Минск: Белорусский государственный университет, 2016. 456 с.
3. Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П. Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2. № 3. С. 581-596.
4. Kogut M.H., Leeand A., Santin E. Microbiome and pathogen interaction with the immune system // Poult Sci. 2020. Vol. 99. Is. 4. P. 1906–1913. DOI: 10.1016/j.psj.2019.12.011.
5. Хайтов Р.М. Иммунология: учебник. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 528 с.
6. Hodgins D.C., Kulkarni R.R., Shewen P.E. Subversion of the Immune Response by Bacterial Pathogens. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 5th Edition. Book Editor(s): J.F. Prescott, A.N. Rycroft, J.D. Boyce, J.I. MacInnes, F. Van Immerseel, J.A. Vázquez-Bolandat. Wiley Blackwell. First published: 2022. DOI: 10.1002/9781119754862.ch5.
7. Iyer V., Sagar V., Toor D., Lyngdoh V., Nongrum G., Kapoor M., Chakraborti A. Group A Streptococcus Infections: Their Mechanisms, Epidemiology, and Current Scope of Vaccines // Cureus. 2022. Vol. 14. Is. 12. 33146. DOI: 10.7759/cureus.33146.
8. Virella G. Medical Immunology, 7th Edition Unknown Binding – Import, 2021. June30.
9. Burroughs N.J., Oliveira B, Pinto A.A., Ferreira M. Immune response dynamics // Mathematical and Computer Modeling. 2011. Vol. 53. Is. 7-8. P. 1410-1419.
10. Козлов В.А. Иммунная парадигма и иммуносупрессивная доминанта в патогенезе основных заболеваний современного человека // Бюллетень сибирской медицины. 2019. Т. 18. № 1. С. 7–17. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-1-7-17.
11. Berti A., Rose W., Nizet V. and Sakoulas G. Antibiotics and Innate Immunity: A Cooperative Effort Toward the Successful Treatment of Infections // Open Forum Infect Dis. 2020. Vol. 7. Is. 8. Ofaa 302. DOI: 10.1093/ofid/ofaa302.
12. Muest N., Wei Chu H. Out-Smarting // Bacteria Maneuvering the Immune Response to Favor Their Survival Front Immunol. 2020. № 11. P. 819. DOI: 10.3389/immu.2020.00819.

13. Abul K. Abbas MBBS, Lichtman A. H. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. 2023. 229 p.
14. Плескановская С.А. Клеточный и гуморальный иммунный ответ при кожном лейшманиозе (экспериментальные исследования и наблюдения на больных): автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 1982. 20 с.
15. Плескановская С.А. Гранулоциты и гранулоцитарный индекс // Здоровоохранение Туркменистана. 1997. № 3. С. 23–26.