

УДК 619:616.98:578.842.1

UDC 619:616.98:578.842.1

**ПРОТИВОКЛЕТОЧНЫЕ ЭФФЕКТОРЫ
ИММУНИТЕТА ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ
СВИНЕЙ****ANTICELLULAR EFFECTORS OF
IMMUNITY AT AFRICAN SWINE FEVER**

Серета Алексей Дмитриевич
д. б. н., профессор
*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной вирусологии и
микробиологии Российской академии
сельскохозяйственных наук, г. Покров, Россия*

Sereda Alexey Dmitrievich
Dr. Sci. Biol., professor
*State Research Institution National Research
Institute for Veterinary Virology and Microbiology of
Russia, Russian Academy for Agricultural Science,
Pokrov, Russia*

Установлены оптимальные условия определения вирусспецифических противоклеточных эффекторов иммунитета при африканской чуме свиней (АЧС). Введение высоких доз аттенуированного шт. ФК-135 позволяет регистрировать активные в антителозависимой клеточной токсичности (АЗКЦ) антитела и первичные цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) на 3 и 6 сутки, соответственно. При заражении свиней вирулентным шт. Ф-32 противоклеточные эффекторы иммунитета не обнаружены

Some optimal conditions to fix virus-specific anticellular effectors of immunity at African swine fever (ASF) were determined. Injection of an attenuated strain FK-135 at high doses enables registration of antibodies active in antibody-dependent cellular toxicity (ADCT) and primary cytotoxic T-lymphocytes (CTL) on days 3 and 6, respectively. After infection of pigs with a virulent strain F-32 not any immunity anticellular effectors were found

Ключевые слова: АФРИКАНСКАЯ ЧУМА
СВИНЕЙ, ЭФФЕКТОРЫ ИММУНИТЕТА

Keywords: AFRICAN SWINE FEVER,
IMMUNITY EFFECTORS

В результате многолетнего поиска традиционных средств и методов специфической профилактики при АЧС стала очевидной необходимость проведения фундаментальных исследований механизмов формирования защиты. Как известно, при АЧС вируснейтрализующих антител не выявлено. Сообщалось об обнаружении в периферической крови животных на 7-15 сутки после инфицирования вирусом АЧС вирусспецифических эффекторов противоклеточных реакций – комплементзависимого цитолиза, АЗКЦ и ЦТЛ [2, 3]. В данной работе изложены методические подходы и результаты изучения развития АЗКЦ и ЦТЛ у свиней в ранний постинфекционный период в зависимости от вирулентности штаммов вируса АЧС.

Условия и методика проведения исследований

Культуру клеток лейкоцитов периферической крови свиней (ЛС) с конечной концентрацией $(2-3) \times 10^6$ клеток/см³ получали по общепринятым методикам, лимфоциты крови свиней выделяли по методу Бейума [1].

Накопление вируса АЧС определяли по конечному десятичному разведению с учетом по гемадсорбции.

Клетки-мишени для определения активности ЦТЛ и антител в АЗКЦ готовили по следующей методике. У экспериментальных подсвинков брали из передней полой краниальной вены 50-100 см³ крови и смешивали с 20 ед./см³ гепарина. Через 1.5-2 часа отбирали «белую кровь» и осаждали центрифугированием при 1000 g 20 минут. Осадок клеток дважды промывали 0.1 % гидролизатом лактальбумина на солевом растворе Эрла, центрифугируя в том же режиме, ресуспендировали до концентрации 2x10⁶ клеток/см³ в среде с 5-10 % прогретой при 56 °С в течение 30 минут гомологичной сыворотки от интактного животного и вносили по 9 см³ в чашки Карреля. За сутки до постановки реакций культуру клеток в половине количества чашек Карреля заражали вирусом АЧС с множественностью 0.1 ГАЕ₅₀/клетка. Одновременно во все чашки вносили по 0.185 МБк/см³ ¹⁴С-уксуснокислого натрия. В момент появления гемадсорбции неприкрепившиеся клетки сливали, а адгезированные — из чашек с зараженными и незараженными культурами клеток снимали метелкой в среде для реакции (RPMI 1640, 10 % фетальной телячьей сыворотки, 2x10⁻² mM 2-меркаптоэтанола, 1 mM глутамин) и осаждали центрифугированием при 800 g в течение 10 минут. Далее клетки трехкратно промывали средой для реакции, центрифугируя в том же режиме. Осадки зараженных или незараженных адгезированных клеток ресуспендировали в среде для реакции в конечной концентрации 10⁵ клеток/см³.

При определении активности сывороток в реакции АЗКЦ в качестве клеток-эффекторов использовали лимфоциты в конечной концентрации 10⁷ клеток/см³, выделенные из периферической крови интактных свиней. В лунки 96-ячеистых микроплат вносили по 100 мкл клеток-мишеней, по 50 мкл клеток-эффекторов и по 50 мкл либо сыворотки интактной свиньи,

либо экспериментальной, либо вместо эффекторных клеток и сывороток – 100 мкл тритона X-100. Инкубировали 4 часа при 37 °С во влажной атмосфере воздуха с 5 % CO₂. Затем клетки осаждали при 400 g в течение 5 минут и в надосадке определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике, после чего рассчитывали процент специфического цитолиза [1].

Результаты исследований

Подавляющее большинство экспериментальных данных, характеризующих вирусспецифические ЦТЛ, получено на лабораторных сингенных животных – мышах и крысах. Для соблюдения правила двойного распознавания при постановке реакции определения ЦТЛ исследовали два подхода: подбор генетически сходных по антигенам главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) подсвинков из одного опороса и использование в качестве клеток-мишеней аутологичных лейкоцитов периферической крови, полученных до инокуляции вируса животным.

Подбор сходных по антигенам ГКГС свиней осуществляли методом смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). Из шести изученных особей лимфоциты свиньи № 5 реагировали на лимфоциты свиньи № 3 практически также как на аутологичные (табл. 1).

Таблица 1 – Индексы стимуляции в смешанной культуре лимфоцитов свиней одного опороса

№№ доноров стимулирующих клеток	Индексы стимуляции отвечающих клеток от доноров №№ 1-6					
	1	2	3	4	5	6
1	0.04	0.65	0.14	1.00	1.00	0.50
2	0.11	0.09	0.21	0.19	0.29	0.48
3	0.34	1.00	0.08	0.09	0.05	0.46
4	0.64	0.44	0.39	0.05	0.32	0.51
5	0.91	1.00	0.21	0.17	0.02	0.60
6	1.00	0.49	1.00	0.36	0.42	0.08

Это послужило основанием для использования свиньи № 3 в качестве

донора клеток-мишеней, а инфицированного 10^9 ГАЕ₅₀ аттенуированного шт. ФК-135 вируса АЧС свиньи № 5 – клеток-эффекторов. Клетки-мишени готовили заражением ЛС, полученных за трое суток до измерения, клетки-эффекторы выделяли в день измерения их активности. Свинью № 1 использовали в качестве донора аллогенных клеток-мишеней. В ходе эксперимента изучали динамику формирования ЦТЛ и оптимальное соотношение эффектор/мишень (табл.2).

Таблица 2 - Динамика активности первичных ЦТЛ свиньи № 5, инфицированной 10^9 ГАЕ₅₀ шт. ФК-135 вируса АЧС, при различных соотношениях эффектор/мишень

Соотношение эффектор/мишень	Процент цитолиза клеток-мишеней							
	0 сут.	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.	10 сут.	12 сут.	14 сут.
10/1	- 0.1	2.0	3.1	5.5	6.3	1.5	1.0	0.1
100/1	0.2	2.2	4.6	18.8	19.0	4.6	2.0	0.5
1000/1	- 0.2	2.4	5.2	20.6	18.8	7.0	2.8	0.2

Из представленных данных следует, что максимум эффекторной активности первичных ЦТЛ наблюдается на 6-8 сутки после инокуляции вируса, а оптимальным соотношением эффектор/мишень является 100/1-1000/1.

Аллогенные, по данным СКЛ, клетки-мишени не подвергались цитолизу, опосредованному вирусспецифическими ЦТЛ.

Таким образом, сходные, по данным СКЛ, по мембранным антигенам особи могут быть использованы в качестве доноров клеток-мишеней и эффекторов при определении ЦТЛ при АЧС.

Для обоснования возможности использования аутологичных адгезивных клеток (А-клеток) культур лейкоцитов периферической крови интактных свиней в качестве клеток-мишеней при тестировании ЦТЛ определяли их антигенпредставляющую способность в процессе культивирования. Культуры клеток ЛС готовили за 8, 6, 4, 2, 0 суток до

инфицирования свиней 10^9 ГАЕ₅₀ вируса АЧС шт. ФК-135. Все пробы А-клеток испытывали в качестве клеток-мишеней на 6 сутки после введения вируса свиньям. Установлено, что антигенпредставляющая способность А-клеток в течение срока культивирования от 6 до 14 суток не изменялась. Процент вирусспецифического цитолиза составлял от 18.5 ± 4.1 до 21.2 ± 3.7 .

Далее была определена активность ЦТЛ периферической крови свиней, инфицированных различными дозами вируса АЧС аттенуированного шт. ФК-135 и вирулентного шт. Ф-32. Эксперименты проводили на 6 сутки после инфицирования животных в аутологичных системах при соотношении эффектор/мишень 100/1. Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют, что ЦТЛ зарегистрированы только у свиней, инфицированных высокими дозами, 10^6 ГАЕ₅₀ и 10^9 ГАЕ₅₀, аттенуированного шт. ФК-135. Свиньи, зараженные вирулентным шт. Ф-32, пали на 7-8 сутки.

Таблица 3 – Активность ЦТЛ периферической крови свиней, инфицированных различными дозами вируса АЧС аттенуированного шт. ФК-135 и вирулентного шт. Ф-32

Штамм вируса АЧС	№ свиньи	Процент цитолиза		
		доза 10^3 ГАЕ ₅₀	доза 10^6 ГАЕ ₅₀	доза 10^9 ГАЕ ₅₀
ФК-135	1	- 9.4* / -5.4**	4.5 / -20.7	21.7 / -7.1
	2	- 1.8 / - 0.2	5.2 / -2.8	20.2 / -1.7
	3	- 0.8 / - 0.0	4.6 / - 3.4	15.0 / -2.0
Ф-32	4	- 18.1 / -10.3	- 4.5 / -2.1	н/д***
	5	- 10.2 / -5.8	- 1.4 / -2.9	н/д

Примечание:

* – процент цитолиза инфицированных клеток;

** – процент цитолиза неинфицированных клеток;

*** – не делали.

В динамике была исследована зависимость доза-ответ вирусспецифических антител сывороток в АЗКЦ. Определение функциональной активности антител в данной реакции осуществляли в естественной системе – культуре клеток ЛС. Три группы свиней

инфицировали вирусом АЧС шт. ФК-135 в дозах 10^3 , 10^6 , 10^9 ГАЕ₅₀. На 0, 3, 6 сутки у животных брали кровь и определяли опосредованный антителами сывороток процент цитолиза интактных и зараженных шт. Ф-32 А-клеток ЛС.

Было установлено, что процент цитолиза и сроки начала его проявления зависят от дозы инокулированного свиньям вируса. Если после введения 10^6 ГАЕ₅₀ вируса АЧС шт. ФК-135 антитела в реакции АЗКЦ обнаруживали на пятые-шестые сутки, то после введения 10^9 ГАЕ₅₀ – на третьи. Очевидно, это связано с обеспечением высокого уровня антигенного стимула (табл. 4).

Таблица 4 – Процент опосредованного противовирусными антителами в реакции АЗКЦ цитолиза клеток-мишеней в присутствии сывороток от свиней, инфицированных различными дозами шт. ФК-135

№ п/п	Доза вируса АЧС, ГАЕ ₅₀	Процент цитолиза		
		0 сутки	3 сутки	6 сутки
1	10^3	0.2* / - 0.7**	0.3 / 0.1	0.2 / - 2.1
2		- 0.9 / - 0.4	- 1.6 / - 4.2	2.0 / - 13.3
3		- 6.7 / - 1.3	0.7 / - 5.3	- 0.9 / - 4.1
4		- 4.9 / - 2.0	- 1.8 / - 14.8	3.7 / - 0.8
5	10^6	- 4.4 / - 3.4	- 0.8 / - 14.8	3.7 / - 0.8
6		- 7.8 / - 1.2	1.7 / - 1.7	4.9 / - 2.2
7		0.3 / - 0.1	- 6.3 / 0.7	13.0 / - 5.2
8	10^9	- 0.6 / 0.8	8.4 / - 0.8	10.3 / - 0.7
9		- 2.0 / - 2.9	18.5 / - 22.1	16.2 / - 2.9
10		- 3.4 / - 12.7	12.2 / - 2.9	14.8 / - 4.1

Примечание:

* – процент цитолиза зараженных клеток;

** – процент цитолиза не зараженных клеток.

Исходя из представлений о решающей роли вирусспецифических эффекторных иммунных механизмов в элиминации вируса АЧС, была изучена взаимосвязь их показателей у зараженных аттенуированным шт. ФК-135 свиней с устойчивостью к заражению вирулентным шт. Ф-32.

Двум свиньям (№№ 1-2) вводили внутримышечно $10^{8.0}$ ГАЕ₅₀, а четырем (№№ 3-6) — 10^3 ГАЕ₅₀ вируса АЧС шт. ФК-135. На 3 и 6 сутки после инфицирования у животных определяли процент цитолиза, опосредованный антителами и ЦТЛ. На 6-е сутки всех инфицированных шт. ФК-135 и двух контрольных (№№ 7-8) свиней заражали 10^4 ГАЕ₅₀ шт. Ф-32 и затем осуществляли клиническое наблюдение, включая термометрирование. Все шесть предварительно инфицированных аттенуированным шт. ФК-135 свиней выжили, оба контрольных - пали. У животных №№ 1-2 температура была в пределах нормы. У свиней №№ 3-6 в течение 3-4 суток отмечали угнетенное состояние и превышающую норму температуру. Цитолиз, опосредованный ЦТЛ, у свиней №№ 1,2 превышал 20 %, антителами в АЗКЦ был около 10 %. У животных №№ 3-6 практически не зарегистрировано активности ЦТЛ и антител в АЗКЦ. Сопоставление показателей эффекторных вирусспецифических противоклеточных реакций в указанные сроки после введения аттенуированного шт. ФК-135 и клинических реакций на контрольное заражение шт. Ф-32 свидетельствует об их взаимосвязи: наличие активных ЦТЛ и антител в АЗКЦ позволяет прогнозировать отсутствие клинических проявлений АЧС после последующего заражения вирулентным штаммом.

Проведенные исследования продемонстрировали возможность использования в экспериментах, требующих соблюдения правила двойного распознавания, как подбора по данным реакции СКЛ сходных по АГКС подсвинок из одного опороса, так и аутологичных клеток, полученных до инокуляции животному вируса. В этих условиях не требуется использование специально адаптированных к перевиваемым культурам клеток штаммов, как это было сделано в работе Wardley et al. [3].

Другой принципиальной особенностью явилось применение для индукции АЧС-специфичных ЦТЛ у свиней высоких доз аттенуированного авирулентного шт. ФК-135. Это позволило выявить первичные ЦТЛ уже на

5-6 сутки после инокуляции вируса. В предыдущих работах сообщалось о начале проявления эффекторной активности ЦТЛ с 11 суток [3]. Следует ожидать, что прогресс в методах тестирования ЦТЛ, в частности использование их вторичной индукции *in vitro*, позволит получить более объективные данные о сроках проявления их активности.

В данной работе в одном эксперименте была охарактеризована иммунологическая реакция свиней на различающиеся по вирулентности штаммы вируса АЧС в ранний постинфекционный период. Полученные результаты наглядно свидетельствуют в пользу мнения В.В. Макарова о ведущей роли эффекторных противоклеточных механизмов в защите от АЧС [2]. Инокуляция свиньям аттенуированного шт. ФК-135 индуцирует вирусспецифический цитолиз зараженных клеток, опосредованный как ЦТЛ с максимумом на 6-8 сутки, так и антителами – на 3-6 сутки. Не вызывает сомнений, что для регистрации первичных эффекторов *in vitro* требуется достижение определенного порогового уровня их концентрации. Это дает основания предполагать, что *in vivo* они начинают выполнять свою положительную роль при меньших концентрациях и раньше.

У зараженных вирулентным шт. Ф-32 свиней ни ЦТЛ, ни антитела в АЗКЦ не обнаруживаются вплоть до гибели. Поскольку как при определении ЦТЛ, так и антител в АЗКЦ клетки-мишени идентичны, а по срокам вторые проявляют активность на трое суток раньше, то можно говорить о важной роли антител против экспонированных на мембране зараженных клеток вирусспецифических белков в ограничении репродукции вируса АЧС в ранние сроки после инфицирования. Идентификация этих белков и обеспечение их оптимальной манифестации на мембранах антигенпредставляющих клеток позволит создать перспективные защитные препараты.

О соотношении вклада ЦТЛ и антител в ограничении репродукции вируса говорить пока преждевременно. Однако эксперименты по

определению уровня эффекторных реакций у животных, инокулированных различными дозами шт. ФК-135, в сочетании с клиническими наблюдениями на последующее заражение вирулентным штаммом Ф-32 продемонстрировали, что наиболее устойчивыми оказались особи с одновременно относительно высокими показателями активности и ЦТЛ, и антител в АЗКЦ.

Список литературы

1. Лефковитц И. Методы исследования в иммунологии / И. Лефковитц, Б. Пернис М.: Мир, 1981. - 486 с.
2. Макаров, В.В. Асимметрия эффекторного звена в противоинфекционном иммунитете [На примере африканской чумы свиней] / В.В. Макаров // Вестник РАСХН. - 1996. - № 2. - С. 33-35.
3. Wardley, R.C. African swine fever virus / R.C. Wardley, C. de M. Andrade, D.N. Black // Arch.Virol. - 1983. - vol.76, № 2. - P. 73-90.