

Експериментальне обґрунтування можливості одержання антипротейної плазми крові

В условиях эксперимента обоснована возможность получения антипротейной плазмы в результате иммунизации кроликов поливалентным протейным антигеном. Антипротейная плазма, антитела которой относятся к классу иммуноглобулина G, характеризуется высокой специфической активностью. Имунный препарат — антипротейная плазма — сохраняет специфическую активность в жидкой (при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$) и в замороженной (при температуре $-20 \pm 5^\circ\text{C}$) формах на протяжении 3 сут и 6 мес соответственно.

Вступ

В останні роки актуальні дослідження направлені на вивчення можливості конструювання імунних препаратів крові проти умовнопатогенних грамнегативних мікроорганізмів, в тому числі проти протей. У практиці охорони здоров'я немає імунних антипротейних препаратів крові.

Нами [4] експериментально вивчена імуногенність полівалентного протейного антигену (ПА) при підшкірному введенні і відпрацьована оптимальна схема щеплення, яка сприяє виробленню специфічного імунітету. Високий вміст антипротейних антитіл в сироватці крові після щеплення виявляється протягом 6 міс. Нами також доведено, що вироблені антипротейні антитіла відносяться до імуноглобулінів класу G.

Метою нашого дослідження було експериментальне обґрунтування можливості конструювання антипротейної плазми крові для визначення принципової можливості і доцільності використання її як імунного препарату крові.

Методика

Дослідження проведене на 19 кроликах породи шиншила обох статей вагою 3,0—3,3 кг та 100 безпорідних мишах вагою 18—20 г. Кроликів щеплювали ПА підшкірно триразово (I, II, III) по 1,0 мл у дозах 0,25; 0,25; 0,5 мг сухого антигену інтервалом 7 діб. Ревакцинацію тварин (0,25 мг ПА в об'ємі 1,0 мл) проводили через місяць. Перед кожним щепленням і щотижня після закінчення вакцинації із краєвої вени вуха кролів брали кров.

Титр специфічних антитіл у сироватці крові тварин вивчали в реакції пасивної гемаглютинації мікрометодом за допомогою полівалентного протейного еритроцитарного діагностикуму виробництва Київського НДІ епідеміології та інфекційних захворювань ім. Л. В. Громашевського. Антипротейну протективну ефективність плазми вивчали в дослідженнях пасивного захисту мишей [1]. Для цього безпорідних мишей внутрішньобрюшинно щеплювали сироваткою або плазмою крові з високим вмістом антипротейних антитіл (дослід) в розведенні 1:10 (фізіологічним розчином) в об'ємі 1,0 мл. Через 2 год мишам також внутрішньобрюшинно вводили 18-годинну живу культуру *P. mirabilis* (штам 1088) в 0,5 мл фізіологічного розчину в різних дозах (500; 250; 125; 62,5; 31,2 млн бактерійних клітин). Нещепленим мишам (контроль) культури вводили за таким же методом (250; 125; 62,5; 31,2; 15,5 млн бактерійних клітин). Вивчення кожної мікробної дози проводили на 5 мишах, за якими протягом 6 діб вели спостереження. Для

© Л. В. НАЗАРЧУК, А. С. ЗВЕРКОВА, А. І. КОВАЛЬ, С. Я. КУБРАЧЕНКО,
О. О. ФЕДОРОВСЬКА, 1992

оцінки специфічної активності (ІЕ), яка до ЛД₅₀ в контролі. [3], співвідношення бактерій в 0,1 моль/л менті потенціалу 5,0 В. ність сукцинатдегідрогеназ кроликів визначали за допомогою Нарцисова (цит. в працях однієї з авторок). Середнього цитоплазматичного показника шляхом розрахунку числа гранул формують 30 клітинах. Патомор

Лімфатичний вузол. Накопичення цитоплазматичних імуноглобулінів G. Реакція гістересиса. Ок. 8, об. 90.

не дослідження внутрішньоклітинними та гістохімічними методами (Браун—Брен), цитоплазматичні [5].

Результати та їх обговорення

Триразове підшкірне введення сироваточних антитіл протейних антитіл черевної порожнини не значення титру $640 \pm 4,0$. Після ревакцинації титр антитіл.

При патоморфологічному дослідженні лімфатичних вузлів після ревакцинації вивчали (малюнок).

Результати вивчення в табл. 2, свідчать про збільшення титру крові збільшувалася титр гався перерозподіл у (%) альбумінової фракції — зростала від 13 до 15 співвідношенні $\alpha_1 : \alpha_2$ (P > 0,05). Треба фракції, можливо, антитіл.

Вивчення активності свідчить, що до проведення складалося $5,53 \pm 0,84$. Після ревакцинації крові збільшувався в

Таблиця 1. Середній титр підшкірного щеплення кролів

Показник	До щеплення	Через 7 діб кожного щеплення	
		I	II
I/T	<20	98	906
±S		3,3	6,5

можливості крові

возможность получения антипротейных кроликов поливалентным плазма, антитела которой относительно характеризуется высокой специфичностью — антипротейная плазма — в жидкой (при температуре 6 ± 2 °C) форме на

направлені на вивчення можливості в крові проти умовнопатогенних числі проти протей. У практиці протейних препаратів крові. на імуногенність полівалентного оному введенні і відпрацьована е виробленню специфічного іму- нтитіл в сироватці крові після . Нами також доведено, що ви- ся до імуноглобулінів класу G. кспериментальне обґрунтування ої плазми крові для визначен- ті використання її як іму-

породи шиншила обох статей мишах вагою 18—20 г. Кроликів II, III) по 1,0 мл у дозах 0,25; м 7 діб. Ревакцинацію тварин и через місяць. Перед кожним вакцинації із краєвої вени вуха

тці крові тварин вивчали в ре- дом за допомогою полівалент- ностикуму виробництва Київ- захворювань ім. Л. В. Грома- ефективність плазми вивчали в й [1]. Для цього безпідірідних сироваткою або плазмою кро- титіл (дослід) в розведенні 1:10 мл. Через 2 год мишам також ну живу культуру *P. mirabilis* чину в різних дозах (500; 250;). Нещепленим мишам (конт- методом (250; 125; 62,5; 31,2; кожної мікробної дози прова- діб вели спостереження. Для

С. Я. КУБРАЧЕНКО,

оцінки специфічної антипротейної активності використовували індекс ефективності (ІЕ), який вираховували як відношення $ЛД_{50}$ в досліді до $ЛД_{50}$ в контролі. Загальний білок визначали біуретовим методом [3], співвідношення білкових фракцій — методом електрофорезу на папері в 0,1 моль/л мединал-вероналовому буфері (рН 8,6) при градієнті потенціалу 5,0 В/см і напрузі 0,4 мА протягом 18 год [6]. Активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) в лімфоцитах периферичної крові кроликів визначали за мето- дом Нарцисова (цит. за [2]), враховуючи одиниці активнос- ті середнього цитохімічного показника шляхом підрахун- ку числа гранул формазану в 30 клітинах. Патоморфологіч-

Лімфатичний вузол. Накопичення клі- тин, утримуючих цитоплазматичний імуноглобулін G. Реакція Sainte-Ma- rie. Імерсія. Ок. 8, об. 90.



не дослідження внутрішніх органів провадили загальновизнаними гіс- тологічними та гістобактеріологічними методами (Грам—Вейгерт, Браун—Брен), цитоплазматичні імуноглобуліни — методом Sainte—Marie [5].

Результати та їх обговорення

Триразове підшкірне введення ПА індукувало вироблення специфічних сироваточних антитіл у тварин (табл. 1). Після вакцинації вміст анти- протейних антитіл через 14 діб був максимальним, і середнє геометрич- не значення титру величини складало $2560 \pm 8,0$, а через 28 діб — $640 \pm 4,0$. Після ревакцинації значно підвищувалася специфічна актив- ність антитіл.

При патоморфологічному дослідженні цитоплазматичних імуногло- булінів у лімфатичних вузлах, тимусі, селезінці тварин на 7—8-му добу після ревакцинації визначено високий вміст імуноглобулінів класу G (малюнок).

Результати вивчення білкового спектру сироватки крові, приведе- ні в табл. 2, свідчать про те, що кількість загального білка сироватки крові збільшувалася після проведеного щеплення ($P < 0,01$). Спостері- гався перерозподіл у співвідношенні альбуміну і глобулінів. Так, доля (%) альбумінової фракції зменшувалася ($P < 0,001$), а гама-глобуліно- вої — зростала від $13,03 \pm 0,89 \%$ до $24,5 \pm 1,76$ ($P < 0,01$), тоді як у співвідношенні $\alpha_1 : \alpha_2 : \beta$ -глобулінових фракцій значних змін не вияв- лено ($P > 0,05$). Треба відмітити, що збільшення гамма-глобулінової фракції, можливо, зв'язано з активним виробленням антипротейних антитіл.

Вивчення активності СДГ в лімфоцитах крові кролів (табл. 3) свідчить, що до проведення щеплення вміст СДГ в лімфоцитах крові складав $5,53 \pm 0,84$. Після I, II і III щеплень вміст СДГ в лімфоцитах крові збільшувався в 2,4; 3,1; 4 рази відповідно. Це вказує на участь

Таблиця 1. Середньгеометричне вмісту антипротейних антитіл до і після підшкірного щеплення кроликів полівалентним протейним антигеном

Показ- ник	До щеп- лення	Через 7 діб після кожного щеплення			Після триразового щеплення			Після реімунізації		
		I	II	III	14-а доба	21-а доба	28-а доба	7-а доба	14-а доба	21-а доба
1/T $\pm S$	< 20	98 3,3	906 6,5	1280 6,9	2560 8,0	1280 7,0	640 4,0	970 6,6	2560 4,0	1280 6,0

лімфоцитів у виробленні специфічних антитіл на введений антиген з мобілізуванням мітохондріальних ферментів.

Беручи до уваги те, що ревакцинація призводить до синтезу антипротейних антитіл, які відносяться до класу імуноглобуліна G, на висоті максимального вмісту антитіл проведено тотальне кровопускання з метою одержання антипротейної плазми. Кров заготовлювали на консерванті глюцидир у співвідношенні 1 : 4. В середньому від тварини брали 150 мл консервованої крові. Після спонтанного відстою стерильно відділяли плазму, яку зберігали в рідкому і замороженому стані при температурі $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ та $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ відповідно. Під час кровопуску ІЕ сироватки крові з титром антипротейних антитіл 1 : 1280 складав 10,0, тоді як в антипротейній плазмі з титром 1 : 640 — 8,0.

Результати вивчення специфічної активності антипротейної плазми свідчать про те, що титр антипротейних антитіл в рідкому стані зберігається 3 доби, а в замороженому — 6 міс.

Таким чином нами експериментально доведено, що ПА може бути використаний як імуноген з метою одержання антипротейної плазми крові. Антипротейна плазма крові кроликів, антитіла якої відносяться до імуноглобуліну класу G, зберігає специфічну активність у рідкому і замороженому стані, що дозволяє рекомендувати її як імунний препарат спрямованої дії з високою протективною активністю для експериментальних досліджень.

Висновки

1. Триразове підшкірне щеплення полівалентним протейним антигеном (0,25—0,25—0,5 мг інтервалом 7 діб) і одноразова ревакцинація (0,25 мг через місяць після закінчення імунізації) індукують високий специфічний гуморальний імунітет.

2. Імунізація полівалентним протейним антигеном призводить до збільшення вмісту антипротейних антитіл і гама-глобулінової фракції сироватки крові, а також активує метаболізм лімфоцитів крові.

3. Імунізація полівалентним протейним антигеном дозволяє одержати імунний препарат крові — антипротейну плазму високої специфічності, антитіла якої відносяться до класу імуноглобуліна G.

Таблиця 2. Білковий спектр сироватки крові кроликів в динаміці щеплення полівалентним протейним антигеном ($M \pm m$)

Показник	До щеплення	Через 7 діб після кожного щеплення			Через 14 діб після дворазового щеплення
		I	II	III	
Загальний білок, г/л	64,8 $\pm$ 3,3	74,3 $\pm$ 1,43	74,1 $\pm$ 2,02	87,6 $\pm$ 4,89	89,0 $\pm$ 3,19
Альбумін, %	65,4 $\pm$ 1,02	59,1 $\pm$ 1,9	62,02 $\pm$ 1,7	48,2 $\pm$ 2,23	48,9 $\pm$ 2,35
Глобулін, %					
α_1	7,1 $\pm$ 1,44	8,18 $\pm$ 0,9	5,81 $\pm$ 0,37	9,6 $\pm$ 0,98	8,9 $\pm$ 0,35
α_2	6,41 $\pm$ 0,48	7,79 $\pm$ 0,98	5,62 $\pm$ 0,17	9,3 $\pm$ 0,55	8,15 $\pm$ 0,78
β	8,19 $\pm$ 0,72	8,65 $\pm$ 0,64	7,58 $\pm$ 0,29	11,2 $\pm$ 0,69	10,7 $\pm$ 0,44
γ	13,03 $\pm$ 0,89	14,35 $\pm$ 0,88	21,1 $\pm$ 1,35	21,8 $\pm$ 2,0	24,5 $\pm$ 1,76

Таблиця 3. Динаміка активності (ум. од.) сукцинатдегідрогінази в лімфоцитах крові кроликів до і після щеплення полівалентним протейним антигеном

Статистичний показник	До щеплення	Через 7 діб після кожного триразового щеплення		
		I	II	III
M	5,58	13,15*	17,47*	22,74*
$\pm m$	0,84	2,32	3,98	1,89

* Значення показників значимо достовірні в порівнянні з такими до щеплення.

4. Антипротейна п...
замороженому (при те...
фічну активність прот...

L. V. Nazarchuk, A. S. Zver...
S. Ya. Kubrachenko, E. A. Fe...

EXPERIMENTAL BASIS C...
TO OBTAIN THE ANTI-PI...

The possibility to produce...
is determined that polyvalen...
mune preparation, that is...
to the class of immunoglob...
and in frozen (at $t = -20^{\circ}\text{C}$ — -5°C)...
respectively.

Research Institute of Blood...
Ministry of Public Health of

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зайднер И. Г., Станисла...
антисыворотки и иммуно...
биол., эпидемиол. и имму...
2. Кисляк Н. С., Ленская Р...
пина, 1978.—175 с.
3. Крылов А. А., Кац А. М...
диагностических лаборато...
4. Назарчук Л. В., Бидненко...
изучение иммуногенности...
1991.—37, № 5.—С. 81—
5. Sainte-Marie. A paraffin...
ce 3 // J. Histochem and C...

Київ. наук.-дослід. ін-т...
гематології та переливання...
М-ва охорони здоров'я Укр...

УДК 612.112.91:612.66+612.313.82

Н. В. Луніна, С. В. Вовк

Вплив блокади β -г...
лізосомального апа...
периферичної крові...
при іммобілізаційн...

В экспериментах на п...
ренорецепторов обзиде...
вызывает в периферии...
у контрольных живот...
мя. Нейтрофильный л...
филов, которая была...
а по срокам наступл...
трофилезу. Уменьшени...
билизации сопровожде...
в сыворотке крови, ка...
ции нейтрофилов.

Сделан вывод, чт...
трофилов, осуществл...
лизосомальных ферме...

© Н. В. ЛУНИНА, С. В. ВОВК

ISSN 0201—8489. Физиол.

антитіл на введений антиген з ментів.

ація призводить до синтезу анти-класу імуноглобуліна G, на виведено тотальне кровопускання зми. Кров заготовлювали на кон-4. В середньому від тварини бра-спонтанного відстою стерильно-дкому і замороженому стані при C відповідно. Під час кровопуску-отейних антитіл 1:1280 складав-титром 1:640—8,0.

активності антипротейної плазми-их антитіл в рідкому стані збері-міс.

ьно доведено, що ПА може бути-держання антипротейної плазми-оликів, антитіла якої відносяться-специфічну активність у рідкому-комендувати її як імунний пре-ективною активністю для експе-

івалентним протейним антигеном-і одноразова ревакцинація-я імунізації) індукують високий

ейним антигеном призводить до-итіл і гама-глобулінової фракції-аболізм лімфоцитів крові.

ейним антигеном дозволяє одер-ротейну плазму високої специфіч-су імуноглобуліна G.

ові кроликів в динаміці щеплення

і кожного щеплення		Через 14 діб після дворазового щеплення
II	III	
1±2,02 2±1,7	87,6±4,89 48,2±2,23	89,0±3,19 48,9±2,35
1±0,37 2±0,17	9,6±0,98 9,3±0,55	8,9±0,35 8,15±0,78
3±0,29 4±1,35	11,2±0,69 21,8±2,0	10,7±0,44 24,5±1,76

сукцинатдегідрогінази в лімфоцитах-тним протейним антигеном

7 діб після кожного триразового щеплення		
	II	III
15*	17,47*	22,74*
32	3,98	1,89

ривнянні з такими до щеплення.

4. Антипротейна плазма в рідкому (при температурі $6^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) і замороженому (при температурі $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$) стані зберігає специфічну активність протягом 6 діб і 6 міс відповідно.

L. V. Nazarchuk, A. S. Zverkova, A. I. Koval,
S. Ya. Kubrachenko, E. A. Fedorovskaya

EXPERIMENTAL BASIS OF THE POSSIBILITY TO OBTAIN THE ANTI-PROTEUS BLOOD PLASMA

The possibility to produce the anti-Proteus plasma is experimentally substantiated. It is determined that polyvalent Proteus antigen immunization permits producing blood immune preparation, that is the high-active anti-Proteus plasma. its antibodies belonging to the class of immunoglobulin G. The anti-Proteus plasma in liquid (at $t=6^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) and in frozen (at $t=-20^{\circ}\text{C}$) forms retains the specific activity for 3 days and 6 months, respectively.

Research Institute of Blood Transfusion,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зайднер И. Г., Станиславский Е. С., Гладус М. А. Изучение протективных свойств антисыворотки и иммуноглобулина к антигенам слизи *P. aeruginosa* // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.—1980.— № 10.— С. 52—56.
2. Кисляк Н. С., Ленская Р. В. Клетки крови у детей в норме и патологии.— М.: Медицина, 1978.—175 с.
3. Крылов А. А., Кац А. М., Кантарович А. С. Руководство для лаборантов клинико-диагностических лабораторий.— М.: Медицина, 1981.—56 с.
4. Назарчук Л. В., Бидненко С. И., Лютко О. Б., Федоровская Е. А. Экспериментальное изучение иммуногенности поливалентного протейного антигена // Физиол. журн.—1991.—37, № 5.— С. 81—87.
5. Sainte-Marie. A paraffin embedding technic for studies employing immunofluorescence 3 // J. Histochem and Cytochem.—1962.— N 10.— P. 250—259.

Київ. наук.-дослід. ін-т
гематології та переливання крові
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов
до редакції 25.12.91

УДК 612.112.91:612.66+612.313.82

Н. В. Луїна, С. В. Вовк

Вплив блокади β -рецепторів на стан лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові кролів при іммобілізаційному стресі

В экспериментах на половозрелых кроликах в условиях блокады β -адренорецепторов обзиданом установлено, что 12-часовая иммобилизация вызывает в периферической крови нейтрофилез, идентичный таковому у контрольных животных, но длившийся менее продолжительное время. Нейтрофильный лейкоцитоз сопровождался дегрануляцией нейтрофилов, которая была более выражена, чем у контрольных животных, а по срокам наступления и продолжительности соответствовала нейтрофилезу. Уменьшение числа лизосом в нейтрофилоцитах после иммобилизации сопровождалось увеличением активности кислой фосфатазы в сыворотке крови, которая соответствовала выраженности дегрануляции нейтрофилов.

Сделан вывод, что β -рецепторы задерживают дегрануляцию нейтрофилов, осуществляют тормозящее влияние на ранее освобождение лизосомальных ферментов.

© Н. В. ЛУЇНА, С. В. ВОВК, 1992