

2. Мошнич П. С., Чернышова Л. И., Бернассовская Е. П., Сельникова О. П. Профилактика дисбактериозов раннего неонатального периода с помощью чистой культуры ацидофильных палочек // Педиатрия.— 1989.— № 3.— С. 25—30.
3. Семина Н. А., Прямухина Н. С. Основные характеристики вспышек внутрибольничных инфекций в СССР в 1986—1988 гг. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.— 1990.— № 10.— С. 60—64.
4. Чернышова Л. И., Костюк О. П., Слуквин И. И. Влияние колонизации желудочно-кишечного тракта бактериями *Klebsiella pneumoniae* на иммунные процессы у «мышей-отъемышей» // Основы физиологии.— 1993.— № 1.— С. 73—78.
5. Bonadio V. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in children. Fifty—seven cases in 10 years // Amer. J. Dis. Child.— 1989.— 143, N 9.— P. 1061—1063.
6. Buts J.-P., Delacroix D. Ontogenic changes in secretory component expression by villous and crypt cells of rat small intestine // Immunology.— 1985.— 54.— P. 181—187.
7. Cross A., Allen J., Burke J. et al. Nosocomial infection due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends // Rev. Infect. Diseases.— 1983.— 5, N 5.— P. 837—845.
8. Heijden P. J., Bianchi A. T. J., Heidt P. J. et al. Background (spontaneous) immunoglobulin production in the murine small intestine before and after weaning // J. of Reprod. Immunol.— 1989.— 15.— P. 217—227.
9. Kereselidze T., Maglacas A. Nosocomial infection — what WHO is doing // J. Hosp. Infect.— 1984.— 5, Suppl. A.— P. 11.
10. Perdigon G., Macias M. E. N. de., Alvares S., Oliver G. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* // Immunology.— 1988.— 63, N 1.— P. 17—23.
11. Pereyra B. S., Falcoff R., Falcoff E., Lemonnier D. Interferon induction by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in mice // Eur. Cytokine. Net.— 1991.— 2, N 4.— P. 299—303.
12. Richard C. Epidemiologie des infections a *Klebsiella pneumoniae* dans deux elevages de singes — ecrevis et de lemuriens // Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.— 1989.— 82, N 4.— P. 458—464.

Київ. ін-т удосконалення лікарів
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов
в редакцію 16.03.93

УДК 612.017.1

К. П. Лященко

Формування імунологічної пам'яті до антигенів мікобактерій туберкульозу у мишей

Исследованиями на мышах установлено, что оптимальная доза антигена для индукции первичного иммунного ответа на *Mycobacterium bovis* составляет 1 мг бактериальных клеток, независимо от их жизнеспособности. Вместе с тем иммунологическая память к микобактериальным антигенам формировалась наилучшим образом у мышей, иммунизированных живыми, а не убитыми, клетками *M. bovis*. Только у таких животных в ходе вторичного ответа наблюдалась повышенная концентрация циркулирующих иммунных комплексов, содержащих противотуберкулиновые антитела и соответствующие антигены микобактерий. Изучен гуморальный иммунный ответ на туберкулин, агрегированный обработкой хлоридом хрома. Показано, что перекрестное сшивание туберкулопротеинов значительно усиливает их иммуногенные свойства. Иммунизация мышей предварительно агрегированным туберкулином сопровождается продуцированием антител против видоспецифичных антигенов *M. bovis* и формированием иммунологической памяти к микобактериальным антигенам. Это позволяет получать гипериммунные высокоспецифические противотуберкулиновые антисыворотки, необходимые для иммунодиагностики туберкулеза и иммунохимического анализа антигенов микобактерий.

© К. П. ЛЯЩЕНКО, 1993

Вступ

В основі до антигенів рення імунітету перебігу імунітету

Продовження в наступних випусках журналу. Середок при туберкульозі імунітету рідкісні аспекти са-ти пізна-її імуні-тету

Метод мораль-антигені-ження з-життєзд

Методик

Дослід-одержав-внутріш-штама І-ної вак-в дозах-тварин-14-у до-100 мкл-гою твер-ючих ім-описани-фракції-колем м-ли 0,2-ництва-ваного

ІФ-лізован- (КАМ)-на на-інкубу-що зв'я-дазою-мікробі-розведе-царія)-томати-лі 492

Дл-бенти-«Phag-кімнат-¹ 3-purified

Вступ

В основі набутого імунітету, як відомо, лежить імунологічна пам'ять до антигенів збудника інфекції. Тому дослідження особливостей утворення імунологічної пам'яті, її цілеспрямованої регуляції — вкрай важливі передумови подальшого вдосконалення засобів та методів активної імунопрофілактики багатьох інфекційних хвороб.

Проблема туберкульозу не перестає займати одне з провідних місць в інфекційній патології людини та тварин. Впродовж багатьох десятиліть зусилля дослідників по вивченню протитуберкульозного імунітету були спрямовані головним чином на пізнання його клітинно-опосередкованих механізмів [5, 9, 10]. Оскільки давно відомо, що антитіла при туберкульозі не грають захисної ролі [1, 8], дослідженню гуморальної імунної відповіді, в тому числі імунологічної пам'яті, на мікобактеріальні антигени не приділялося достатньої уваги. Проте всебічне вивчення саме цих питань імунології туберкульозу могло б значно сприяти пізнанню особливостей патогенезу інфекції, а також вдосконаленню її імунодіагностики.

Мета роботи — з'ясування основних закономірностей розвитку гуморальної імунної відповіді та формування імунологічної пам'яті до антигенів *Mycobacterium bovis* у мишей. В завдання входило дослідження залежності вказаних процесів від дози введених мікобактерій, їх життєздатності та інших особливостей імуногену.

Методика

Досліди проведені на мишах ліній СВА та BALB/c масою 18—20 г, одержаних із підприємства «Глеваха» АН України. Тварин імунізували внутрішньочеревним введенням вбитих нагріванням клітин *M. bovis* штама Bovinus-8 (Курська біофабрика) або живої протитуберкульозної вакцини *M. bovis* БЦЖ (Ташкентський НДІ вакцин і сироваток) в дозах 0,1, 1 та 5 мг/миша. Через 6 тижнів мишей усіх груп (по 7—8 тварин у кожній) реімунізували введенням 1 мг вакцини БЦЖ. На 14-у добу імунної відповіді із хвостової вени отримували близько 100 мкл крові для визначення вмісту сироваткових антитіл за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА), а також циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), які містять антигени мікобактерій, за описаним раніше [3] методом. Останній полягає в довготривалому ІФА фракції білків, осаджених із сироватки крові 3,5 %-вим поліетиленгліколем молекулярною масою 6 000 Д. В окремих дослідах мишам вводили 0,2 мг очищеного білкового деривату туберкуліну (БДТ)¹ виробництва Курської біофабрики та цього ж препарату, попередньо агрегованого (БДТ-а) обробкою хлоридом хрому, як описано раніше [2].

ІФА провадили на 96-коміркових полістирольних платах з імобілізованим БДТ або комплексним алергеном атипичних мікобактерій (КАМ) виробництва Курської біофабрики з розрахунку 0,1 мкг антигена на лунку. Сироватку крові імунізованих мишей, розведену 1 : 100, інкубували в платах протягом 2 год при 37 °С. Для виявлення антитіл, що зв'язалися з твердою фазою, застосовували кон'юговані з пероксидазою хрому кролячі антитіла проти імуноглобулінів миші (Інститут мікробіології та епідеміології ім. М. Ф. Гамалеї РАМН) в робочому розведенні 1 : 1 000, а також ортофенілендіамін (фірма «Fluka», Швейцарія) як субстрат реакції. Оптичну густину (ОГ₄₉₂) вимірювали на автоматичному мікроколориметрі Dynatech-580 (США) при довжині хвилі 492 нм.

Для афінно-хроматографічної очистки антитіл готували імуносорбенти з БДТ та КАМ на основі ВгCN-активованої сефарози 6В (фірма «Pharmacia», Швеція) [2]. Сироватку крові протягом 30—40 хв при кімнатній температурі пропускали через колонку з імуносорбентом

¹ За загальноприйнятою скороченою назвою — ППД — від англ. PPD (tuberculin purified protein derivative).

емкістю 10 мл. Після ретельного відмивання фізіологічним розчином сорбенту антитіла, які зв'язалися з ним, елюювали за допомогою розчину роданіду калію (3 моль/л) з наступним діалізом проти фізіологічного розчину. З метою перехресного виснаження антитіла до БДТ пропускали через колонку з КАМ-сорбентом. Активність та специфічність отриманих антитіл оцінювали за методом ІФА. Цифровий матеріал обробляли статистично з використанням критерію *t* Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Попередні досліді показали, що гуморальна імунна відповідь на *M. bovis* у мишей досягає максимального значення через 2 тиж після імунізації, незалежно від дози та життєздатності введених мікобактерій. Тому при проведенні решти експериментів вміст сироваткових антитіл визначали саме в цей період.

Встановлено, що введення мишам 1 мг живих або вбитих клітин *M. bovis* призводить до більш інтенсивного утворення антитіл порівняно з ін'єкціями 0,1 чи 5 мг мікобактерій (таблиця). Повторна імунізація тварин вакциною БЦЖ викликала вторинну імунну відповідь, що помітно перевищувала первинну. Разом з тим, на відміну від останньої, найвищий вміст сироваткових антитіл був зареєстрований у реімунізованих мишей, яким спочатку вводили 5 мг мікобактерій (див. таблицю). Отже, оптимальні дози корпускулярного антигену *M. bovis* для індукції первинної імунної відповіді та імунологічної пам'яті не співпадають. Подібну закономірність ми спостерігали раніше при вивченні імунологічної пам'яті до стафілококових антигенів [4].

Показано, що вторинна імунна відповідь у мишей, яким попередньо вводили життєздатні мікобактерії, була значно вищою, ніж у тварин, первинно імунізованих відповідними дозами інактивованих мікроорганізмів. Для досягнення такого імунізуючого ефекту, який викликало введення 0,1 мг живих клітин *M. bovis*, необхідно було 5 мг вбитих мікобактерій, тобто в 50 разів більше. Цікаво зазначити, що у випадку первинного утворення антитіл таких відмінностей немає (див. таблицю). Очевидно, життєздатність *M. bovis* позначається перш за все на індукції саме В-клітин імунологічної пам'яті у імунізованих мишей, але не на активації первинних В-клітин, які диференціюються в антитілопродуценти. Знайдена закономірність, а також вказана вище відсутність єдиної оптимальної дози мікобактерій для первинної імунної відповіді та формування імунологічної пам'яті підтверджують уявлення про відносну незалежність цих двох пов'язаних в часі напрямів В-клітинного імуногенезу, індукованого антигеном.

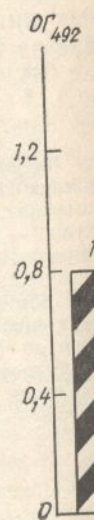
Відомо, що певна частина сироваткових антитіл, що синтезуються під час імунної відповіді, реагує з відповідними антигенами, утворюючи ЦІК, і тому не виявляється в серологічних реакціях. В зв'язку з

Залежність первинної та вторинної імунної відповіді на *M. bovis* у мишей від життєздатності та дози введених мікобактерій

Антиген, доза	Імуноферментний аналіз, ОГ ₄₉₂	
	Первинна відповідь	Вторинна відповідь
Живі клітини <i>M. bovis</i>		
0,1 мг/миша	0,71±0,09	1,46±0,09
1,0 мг/миша	0,96±0,06	1,67±0,11
5,0 мг/миша	0,84±0,05	1,84±0,08
Вбиті клітини <i>M. bovis</i>		
0,1 мг/миша	0,78±0,10	1,32±0,06
1,0 мг/миша	0,94±0,09	1,38±0,07
5,0 мг/миша	0,80±0,07	1,49±0,09

Примітка. Миші усіх груп реімунізовані 1 мг живих клітин *M. bovis* через 6 тиж. після первинної імунізації.

цим ми виз
або напівза
мишей. Вст
bovis супро
жить від ж
зації мише
винну, спос



Мал. 1. Вміст антитіл у сироватці мишей, імунізованих живими клітинами *M. bovis*

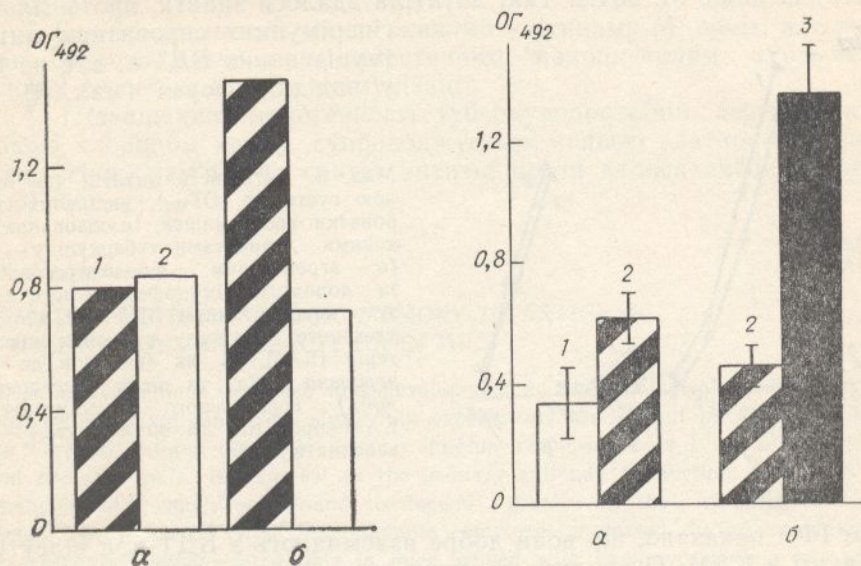
Мал. 2. Вміст антитіл у сироватці мишей, імунізованих вбитими клітинами *M. bovis*

мікобакте
мишей, я
різнялася

Отри
бактерій
розвиток
рацією н
тять. Оск
ням, мож
беруть у
vis. Слід
на живі
татами
свідчать
щодо фо
дати дос
вакцина

Тубе
[6]. Ран
ті БДТ
рехресно
застосов
сировато
В д
БДТ у
а також

цим ми визначали концентрацію таких ЦІК, які містять заблоковані або напівзаблоковані антитіла проти антигенів БДТ, у імунізованих мишей. Встановлено, що одноразова імунізація тварин клітинами *M. bovis* супроводжується появою ЦІК, кількість яких практично не залежить від життєздатності введених мікобактерій. Однак після реімунізації мишей вторинна ЦІК-відповідь, що помітно перевищувала первинну, спостерігалася лише у тварин, попередньо імунізованих живими



Мал. 1. Вміст циркулюючих імунних комплексів (за оптичною густиною, OG_{492}) у мишей, імунізованих одноразово (а) живими (1) або вбитими (2) та повторно (б) живими клітинами *M. bovis*.

Мал. 2. Вміст антитіл (за оптичною густиною, OG_{492}) до білкового деривату туберкуліну (БДТ) в сироватці крові мишей, імунізованих одноразово БДТ (1) або агрегованим БДТ (БДТ-а, 2) та дворазово БДТ-а (3): а — первинна відповідь на БДТ та БДТ-а, б — первинна та вторинна відповіді на ЛДТ-а.

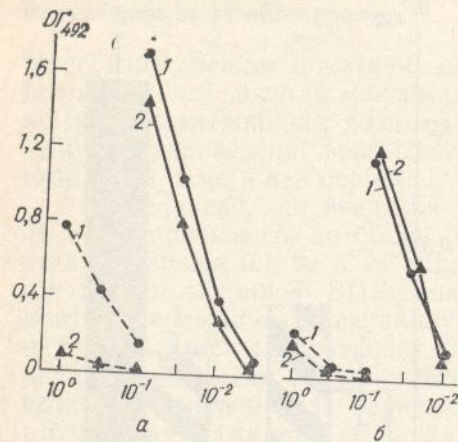
мікобактеріями (мал. 1). Концентрація ЦІК у повторно імунізованих мишей, яким спочатку вводили вбиті клітини *M. bovis*, суттєво не відрізнялася від показника первинної ЦІК-відповіді.

Отримані результати вказують на спроможність життєздатних мікобактерій активувати механізми імунологічної пам'яті, які обумовлюють розвиток анамнестичної реакції зареєстрованої за підвищеною концентрацією не лише вільних сироваткових антитіл, але й ЦІК, що їх містять. Оскільки інактивація мікобактерій була проведена автоклавуванням, можна припустити, що в утворенні ЦІК після реімунізації мишей беруть участь термолабільні антигени, властиві живим клітинам *M. bovis*. Слід зазначити, що знайдені відмінності вторинної ЦІК-відповіді на живі і вбиті мікобактерії узгоджуються з наведеними вище результатами порівняльного вивчення анамнестичного антитілоутворення та свідчать про значно вищу імуногенність життєздатних клітин *M. bovis* щодо формування імунологічної пам'яті. У зв'язку з цим доцільно згадати дослідження інших авторів [11], в яких лише жива стафілококова вакцина викликала імунологічну пам'ять після імунізації овець.

Туберкулінові препарати відносять до порівняно слабких антигенів [6]. Раніше нами був описаний спосіб значного посилення імуногенності БДТ [2], що полягає в агрегації туберкулопротеїнів внаслідок їх перекресного зшивання під дією хлориду хрому. Цей підхід був успішно застосований для імунізації кролів з метою одержання гіперімунних сироваток проти БДТ.

В досліджах на мишах встановлено, що БДТ-а помітно переважає БДТ у розчинній формі за здатністю викликати продукування антитіл, а також формування імунологічної пам'яті (мал. 2), без чого немож-

ливо було б досягти високої концентрації протитуберкулінових антитіл після багаторазової імунізації. Методом афінної хроматографії із сироватки крові мишей, імунізованих БДТ та БДТ-а, були виділені антитіла, які піддавали перехресному виснаженню пропусканням через колонку, заповнену Кам-сорбентом. Метою цієї процедури було позбавлення від антитіл проти спільних для туберкульозних та атипових мікобактерій антигенів та виявлення популяції антитіл проти білків БДТ, властивих лише *M. bovis*. Такі антитіла вдалося знайти, проте тільки в гіперімунних сироватках мишей, імунізованих БДТ-а, але не БДТ у вихідній формі (мал. 3). Ме-



Мал. 3. Активність антитіл (за оптичною густиною, OG_{492}), виділених із сироватки крові мишей, імунізованих білковими дериватами туберкуліну — БДТ (а — агрегованим, б — неагрегованим), за допомогою імуноферментного аналізу з використанням БДТ (1) або комплексного алергену атипових мікобактерій (КАМ, 2) як антигенів до (безперервна лінія) та після (переривчаста лінія) перехресного виснаження на КАМ-сорбенті. За віссю абсцис — розведення антитіл.

тодом ІФА показано, що вони добре взаємодіють з БДТ при відсутності реакції з КАМ. Очевидно, ці антитіла мишей, подібно до отриманих раніше аналогічним способом кролячих антитіл [2], здатні розпізнавати видоспецифічні антигени *M. bovis*.

Отже, підвищена імуногенність БДТ-а відрізняється від такої розчинного препарату не лише кількісно, але й якісно, оскільки обумовлює індукцію імунологічної пам'яті та продукцію антитіл нової специфічності. Цікаво у зв'язку з цим, що одночасно з реалізацією описаного нами підходу для посилення імуногенних властивостей БДТ обробкою хлоридом хрому [2] іншим авторам також вдалося отримати високоактивні протитуберкулінові сироватки шляхом імунізації кролів продуктом хімічної олігомеризації низькомолекулярних поліпептидів БДТ за допомогою іншого перехресно-зшиваючого реагенту [6].

Підсумовуючи результати наших досліджень в цілому, можна зазначити, що гуморальна імунна відповідь та розвиток імунологічної пам'яті до мікобактеріальних антигенів у мишей значною мірою залежать від певних особливостей імуногену. Слід визнати досить суттєвим, що саме життєздатні клітини *M. bovis* спроможні досить ефективно індукувати В-клітини імунологічної пам'яті. Очевидно, знайдений факт необхідно мати на увазі при розробці альтернативної протитуберкульозної вакцини. Імунізація тварин БДТ-а з підвищеною імуногенністю дозволить отримувати гіперімунні протитуберкулінові сироватки та, в майбутньому, моноклональні антитіла, специфічні до окремих епітопів туберкулопротеїнів. Такі антитіла вкрай необхідні для ідентифікації, виділення та імунохімічного аналізу відповідних мікобактеріальних антигенів.

Хоча давно відомо про накопичення ЦІК при туберкульозі [1, 8], закономірності їх утворення залишаються не вивченими. Проте, на думку багатьох дослідників, наявність та концентрація ЦІК, що містять певні мікобактеріальні антигени, — найбільш точний та інформативний серологічний критерій активації туберкульозного процесу [7, 8]. Тому подальше вивчення антигенспецифічних ЦІК в імунній відповіді на мікобактерії буде сприяти вдосконаленню імунодіагностики туберкульозу та інших мікобактеріальних інфекцій, а також глибшому розумінню механізмів їх імунопатогенезу.

Висновки

1. Оптимальна доза антигена для індукції первинної імунної відповіді на *M. bovis* у мишей становить 1 мг/миша бактеріальних клітин, незалежно від їх життєздатності.

2. Розвиток імунологічної пам'яті до антигенів *M. bovis*, на відміну від первинної відповіді, залежить від дози та життєздатності мікобактерій.

3. Імунізація мишей тільки живими клітинами *M. bovis*, але не вбитими, супроводжується анамнестичним накопиченням циркулюючих імунних комплексів після реімунізації.

4. Підвищення імуногенності туберкулопротеїнів, агрегованих обробкою хлоридом хрому, супроводжується появою здатності викликати імунологічну пам'ять та синтез антитіл проти видоспецифічних антигенів *M. bovis*.

К. Р. Lyashchenko

FORMATION OF IMMUNOLOGIC MEMORY TO ANTIGENS OF TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN MICE

The antibody immune response and development of immunological memory to *Mycobacterium bovis* antigens were studied in experiments carried out on CBA and BALB/c mice. Optimal antigen doses for primary immune responses were 1 mg of both live and killed bacterial cells. In contrast to the primary antibody production, formation of the immunological memory was found to depend greatly on the viability of *M. bovis* injected. The levels of circulating immune complexes increased during secondary antibody responses demonstrated only in mice primed with live mycobacteria but not with killed ones. Aggregation of a purified derivative of tuberculin protein by crosslinking polypeptides using chromium chloride resulted in a significant enhancement of their immunogenic properties providing the high level of immunological memory formation as well as production of the antibodies against *M. bovis* specific antigens.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авербах М. М., Литвинов В. И. Иммунология и иммуногенетика туберкулеза: состояние и перспективы развития исследований // Пробл. туберкулеза.— 1989.— № 2.— С. 65—68.
2. Бобровник С. А., Лященко К. П., Комиссаренко С. В. Получение антител к видоспецифическим антигенам *M. bovis* // Журн. микробиол.— 1990.— № 12.— С. 51—53.
3. Бобровник С. А., Лященко К. П. Определение антигенспецифических иммунных комплексов иммуноферментным методом // Там же.— 1991.— № 1.— С. 67—70.
4. Лященко К. П. Механизмы регуляции иммунологической памяти // Физиол. журн.— 1988.— № 3.— С. 101—108.
5. Покровский В. И., Авербах М. М., Литвинов В. И., Рубцов И. В. Приобретенный иммунитет и инфекционный процесс.— М.: Медицина, 1979.— 280 с.
6. Bardarov S. S., Kriakov J., Karakiashyan A. et al. Characterization of PPD protein antigens in whole cell lysates of *Mycobacterium bovis* BCG // FEMS Microbiol. Lett.— 1990.— 71, N 1—2.— P. 89—93.
7. Daniel T. M. Circulating immune complexes in tuberculosis // Amer. Rev. Respirat. Dis.— 1986.— 134, N 2.— P. 199—201.
8. Daniel T. M., Debanne S. M. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay // Ibid.— 1987.— 135, N 5.— P. 1137—1151.
9. Dannenberg A. M. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis // Rev. Infect. Dis.— 1989.— 11, suppl. 2.— P. 369—378.
10. Kaufmann S. H. E. Leprosy and tuberculosis vaccine design // Trop. Med. Parasit.— 1989.— 40.— P. 251—257.
11. Kennedy Y. W., Watson D. L., Bennell M. A. The early phase of the immune response to live and killed *Staphylococcus aureus* vaccines in sheep—cellular and immunoglobulin parameters // Vet. Immunol. and Immunopathol.— 1981.— 2, N 4.— P. 367—380.

Ин-т біохімії ім. О. В. Палладіна АН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 25.12.92