

**В.В. Войткова, В.И. Дубровина, С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова,
К.М. Корытов, С.В. Балахонов**

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ АРГЕНТОГАЛАКТОМАНАННА И АРГЕНТО-ПОЛИ-1-ВИНИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛА

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока (Иркутск)

В статье представлены результаты исследования влияния металлосодержащих нанокompозитов на содержание В- и Т-лимфоцитов селезенки белых мышей. Фенотипический анализ суспензии клеток селезенки проводили методом проточной цитометрии на приборе BD FACSCanto™ II. Показано стимулирующее влияние препаратов на формирование иммунного ответа, что подтверждается увеличением содержания В-лимфоцитов и Т-хелперов и свидетельствует о кооперационных взаимодействиях между клетками иммунной системы. Экспериментально показано, что препараты 2-Н-ПВТ-Аг, ГМ-Аг могут быть рекомендованы для дальнейшего исследования с целью повышения защитных свойств организма.

Ключевые слова: селезенка, субпопуляционный состав, нанокompозит, аргентогалактомананн, аргенто-поли-1-винил-1,2,4-триазол

CHANGE OF THE COMPOSITION OF SPLENIC LYMPHOCYTES AT THE EFFECT OF ARGENTOGALACTOMANANN AND ARGENTO-POLY-1-VINYL-1,2,4-TRIAZOLE ON THE EXPERIMENTAL ANIMALS

**V.V. Voytkova, V.I. Dubrovina, S.A. Vityazeva, T.P. Starovoytova, K.M. Korytov,
S.V. Balakhonov**

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

The article presents the results of the research of effect of metal-containing nanocomposites on the content of splenic B- and T-lymphocytes of white mice. Phenotypic analysis of the spleen cells suspension was conducted by flow cytometry on BD FACSCanto™ II. Stimulating effect of these medications on the immune response formation is showed and is proved by the increase of content of B-lymphocytes and T-helper cells and it indicates cooperative interactions between the cells of immune system. It was experimentally showed that the medications 2-N-HTP-Ag, GM-Ag can be recommended for the further research in order to increase protective properties of an organism.

Key words: spleen, subpopulation structure, nanocomposite, argentogalactomanann, argento-poly-1-vinyl-1,2,4-triazole

Число работ, посвященных изучению свойств иммуномодуляторов, растет с каждым годом. Интерес к веществам данной группы обусловлен, прежде всего, тем, что они способны влиять на отдельные звенья иммунного ответа. Такие свойства иммуномодуляторов играют важное значение при создании вакцин с целью повышения их иммуногенности. Однако не все известные иммуномодуляторы могут быть применены в связи с их токсичностью.

В настоящее время актуальной является разработка новых биологически активных форм синтетических препаратов медицинского назначения в форме наночастиц. Особый интерес представляют такие металлосодержащие полимерные композиты, как аргентогалактомананн (ГМ-Аг) и аргенто-поли-1-винил-1,2,4-триазол (2-Н-ПВТ-Аг), проявляющие иммуномодулирующие и бактерицидные свойства [1, 3, 6].

Известно, что основной функцией иммунной системы является формирование адекватного и эффективного иммунного ответа. При этом важная роль отводится иммунокомпетентным органам, в частности, селезенке. Тем не менее, в литературе отсутствует цитологическая характеристика состояния селезенки экспериментальных животных, инокулированных металлосодержащими полимерными композитами.

Цель исследования: характеристика изменения популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов селезенки у экспериментальных животных под воздействием аргентогалактомананна и аргенто-поли-1-винил-1,2,4-триазола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 50 сертифицированных (НПО «Вектор», Новосибирск) беспородных белых мышей, стандартных по условиям содержания и весу (массой 15–20 г).

В качестве объектов исследования использовали два полимерных нанокompозита: аргентогалактомананн (ГМ-Аг) [5] и аргенто-поли-1-винил-1,2,4-триазол (2-Н-ПВТ-Аг) [6]. Препараты вводили подкожно в правую заднюю лапу в дозе 2 мг/кг в 0,5 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР, pH 7,2). Контролем служили белые мыши, получившие ЗФР в объеме 0,5 мл. Учет результатов проводили на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки. Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 и Приложением к Приказу Минздрава РФ № 267 от 2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Суспензию клеток селезенки получали по общепринятой методике [4]. Оценку клеточного состава проводили в панели CD45-APC/CD3-FITC/CD4-Alexa-700/CD8-APC-Cy7/CD19-PE-Cy7. Для лизирования эритроцитов суспензию клеток селезенки центрифугировали при 200 g в течение 5 мин., осадок ресуспендировали в 2 мл рабочего десятикратного буфера BD FACS Lysing Buffer (BD Biosciences, США), аккуратно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 3–4 мин. По истечении времени образцы центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Клетки селезенки подсчитывали в камере Горяева и доводили до концентрации 2×10^7 кл./мл 3ФР. В полистироловые пробирки BD Falcon™ 12 × 75 мм раскапывали по 50 мкл (10^6) клеток. Для предотвращения неспецифического связывания иммуноглобулинов с Fcγ II/III (CD32/CD16) рецепторами лимфоцитов, которое приводит к появлению высокого фона, до окрашивания специфическими флуоресцентными антителами суспензию клеток селезенки преинкубировали с 2 мкл Mouse BD Fc Block™ в течение 10 мин на льду. Рабочий раствор моноклональных антител готовили в буфере BD Cell WASH (BD Biosciences, США) [2], вносили в исследуемые образцы по 100 мкл, аккуратно перемешивали и инкубировали (в темноте) в течение 30 мин при 4 °C. Затем образцы отмывали в 1 мл холодного BD Cell WASH (BD Biosciences, США) буфере при 200 g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл холодного BD Cell WASH (BD Biosciences, США).

Анализ проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II в программе BD Diva 6.0. В каждой пробе собирали 100 000 CD45⁺-клеток, которые идентифицировали на графике SSC/CD45. В результате иммунофенотипического анализа спленоцитов определяли процентное содержание В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺), Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), незрелых CD3⁺CD4⁺CD8⁻ и CD3⁺CD4⁻CD8⁻ клеток.

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартного пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.; 19842001, ИПЧИ 31415926535897) с использованием непараметрических тестов U-критерия Манна – Уитни и Спирмена (r_s). Для каждой выборки вычисляли M – среднее арифметическое и s – среднее квадратичное отклонение. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе экспериментов установлено, что показатели содержания оцениваемых субпопуляций лимфоцитов у интактных мышей между сроками наблюдения не имело статистической значимости. В связи с этим значения содержания субпопуляций лимфоцитов интактных представлены как усредненные показатели.

При оценке динамики содержания зрелых Т-клеток в селезенке экспериментальных животных под действием ГМ-Аг и 2-Н-ПВТ-Аг на 14-е и 21-е сутки зарегистрировано достоверное снижение содержания CD3⁺-клеток, по сравнению с контролем (табл. 1). Однако в случае инокуляции мышам ГМ-Аг выявлена тенденция к повышению этого показателя на 3-и и 7-е сутки ($p = 0,08$). Анализ субпопуляций Т-лимфоцитов у мышей, иммунизированных как ГМ-Аг, так и 2-Н-ПВТ-Аг, показал достоверное снижение цитотоксических Т-лимфоцитов во все сроки наблюдения, по сравнению с интактными животными. В ходе исследований нами установлено повышение содержания Т-хелперов в селезенке на 7-е сутки после введения препаратов в среднем в 1,3 раза, по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

При воздействии 2-Н-ПВТ-Аг или ГМ-Аг в селезенке мышей наблюдалось достоверное повышение содержания В-лимфоцитов на 14-е и 21-е сутки наблюдения, по сравнению с контролем (рис. 1). При введении мышам ГМ-Аг выявлено снижение значений на 3-и сутки в среднем в 1,5 раза,

Таблица 1
Показатели содержания субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенке мышей, иммунизированных ГМ-Аг и 2-Н-ПВТ-Аг ($M \pm s$)

Показатель (%)	Контроль	Препарат	Сроки наблюдения, сутки			
			3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
CD3 ⁺ CD19 ⁻	65,6 ± 5,5	ГМ-Аг	68,41 ± 0,8	72,8 ± 2,0	41,9 ± 5,5**	52,5 ± 5,0**
		2-Н-ПВТ-Аг	63,8 ± 2,8	64,8 ± 1,8	44,4 ± 5,9**	47,9 ± 1,1**
CD3 ⁺ CD8 ⁺	22,3 ± 1,5	ГМ-Аг	9,2 ± 0,6**	12,7 ± 3,1**	8,7 ± 0,3**	7,6 ± 0,6**
		2-Н-ПВТ-Аг	15,1 ± 3,3**	16,4 ± 3,0**	9,1 ± 2,4**	7,2 ± 1,3**
CD3 ⁺ CD4 ⁺	36,3 ± 3,0	ГМ-Аг	36,5 ± 1,9	48,8 ± 8,0*	35,7 ± 6,8	35,8 ± 3,8
		2-Н-ПВТ-Аг	40,8 ± 9,2	41,2 ± 5,2*	31,7 ± 2,4	32,3 ± 0,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	0,8 ± 0,2	ГМ-Аг	0,4 ± 0,1*	0,4 ± 0,1*	1,1 ± 0,2**	1,3 ± 0,3**
		2-Н-ПВТ-Аг	0,3 ± 0,1*	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,6 ± 0,3**
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	5,4 ± 1,2	ГМ-Аг	10,0 ± 0,3*	3,2 ± 0,6	3,8 ± 1,0*	7,8 ± 0,7*
		2-Н-ПВТ-Аг	5,5 ± 1,6	3,3 ± 0,5	2,8 ± 1,0*	7,5 ± 0,8*

Примечание: различия, по сравнению с контролем, статистически значимы при * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,03$.

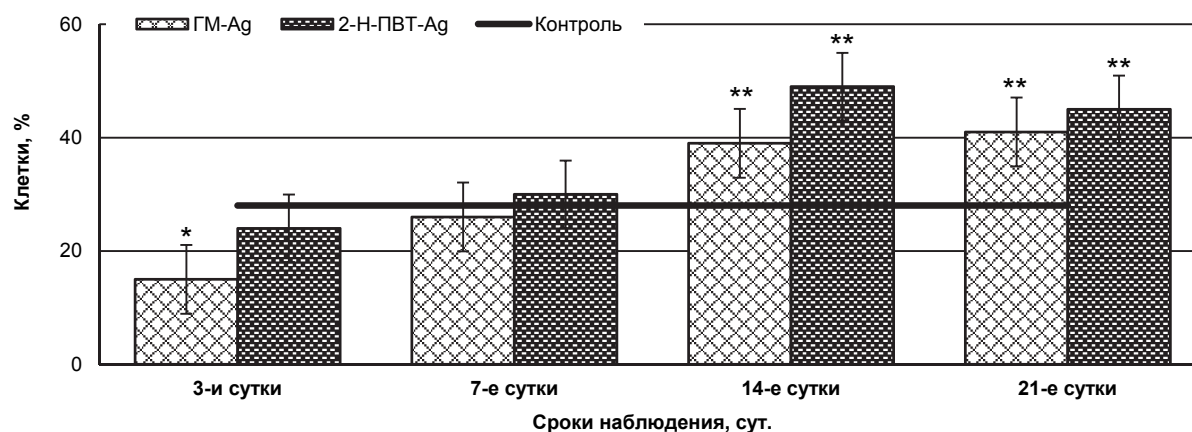


Рис. 1. Оценка процентного содержания В-лимфоцитов в селезенке у мышей после инъекции ГМ-Аг и 2-Н-ПВТ-Аг ($M \pm s$): различия с контролем значимы при * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,03$.

по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что 2-Н-ПВТ-Аг оказывает наибольшее влияние на данный показатель, по сравнению с ГМ-Аг, на 14-е сутки ($p = 0,023$), тем не менее, к 21-м суткам значения процентного содержания В-лимфоцитов в селезенке мышей после инъекции наноконструктами достоверно не отличались.

Корреляционный анализ показал, что в группе контроля, а также у мышей, получивших экспериментальные препараты, содержание В-лимфоцитов находилось в обратной взаимосвязи от содержания Т-лимфоцитов ($r_s = -0,75$; $p = 0,001$). После инокулирования мышам 2-Н-ПВТ-Аг или ГМ-Аг отмечалось появление корреляций $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ с $CD3^+CD19^+$ -клетками ($r_s = -0,60$; $p = 0,001$ и $r_s = -0,73$; $p = 0,0001$ соответственно), а также с Т-лимфоцитами ($r_s = 0,70$ и $r_s = 0,68$; $p = 0,0001$ соответственно). Кроме того, при введении 2-Н-ПВТ-Аг или ГМ-Аг у мышей зарегистрированы корреляции $CD3^+CD4^+CD8^+$ -клеток с Т- ($r_s = 0,88$; $p = 0,0001$) и В-лимфоцитами ($r_s = -0,67$; $p = 0,001$).

Таким образом, экспериментальные препараты 2-Н-Аг-ПВТ и ГМ-Аг оказывают влияние на иммунную перестройку организма белых мышей. Подтверждением этому являются как ранее полученные данные о способности этих препаратов повышать резистентность организма (предохранять 30–50 % экспериментальных животных от заболевания чумой, сибирской язвой и летального исхода) [1], так и результаты настоящего исследования. Так, 2-Н-Аг-ПВТ и ГМ-Аг активируют в селезенке пролиферацию $CD3^+CD19^+$ -клеток, что выражалось в увеличении содержания популяции В-клеток на 14-е и 21-е сутки наблюдения. Это подтверждается повышением их содержания в маргинальной зоне [3]. Следует отметить, что увеличение числа Т-хелперов свидетельствует о кооперационных взаимодействиях между клетками иммунной системы, а также о формировании клеточного иммунитета. Достоверных различий между ГМ-Аг и 2-Н-ПВТ-Аг по их влиянию на субпопуляционный состав селезенки экспериментальных животных не выявлено. Тем не менее, 2-Н-ПВТ-Аг оказывал

наибольшее влияние на содержание В-лимфоцитов на 14-е сутки. Полученные в ходе экспериментов данные свидетельствуют о реализации иммунного ответа организма белых мышей на воздействие экспериментальных препаратов 2-Н-ПВТ-Аг или ГМ-Аг с участием селезенки.

Экспериментально показано, что препараты 2-Н-ПВТ-Аг, ГМ-Аг, могут быть рекомендованы для дальнейшего исследования с целью повышения защитных свойств организма.

ВЫВОДЫ

Установлено, что 2-Н-ПВТ-Аг, ГМ-Аг способствуют увеличению числа Т-хелперов на 7-е сутки наблюдения, что свидетельствует о кооперационных взаимодействиях между клетками иммунной системы, а также о формировании клеточного иммунитета.

Увеличение количества В-клеток в селезенке экспериментальных животных на 14–21-е сутки подтверждает развитие гуморального иммунитета в ответ на введение полимерных наноконструктов.

Изменение содержания незрелых популяций Т-лимфоцитов ($CD3^+CD4^+CD8^+$, $CD3^+CD4^+CD8^-$) указывает на их участие в реакциях иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Витязева С.А., Старовойтова Т.П., Дубровина В.И. Сравнительная характеристика иммунного ответа макроорганизма при пероральном и парентеральном введении металлосодержащего нанобиоконструкта // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 2 (84). – С. 114–117.
2. Vityazeva S.A., Starovoytova T.P., Dubrovina V.I. Comparative analysis of immune response of macroorganism at oral and parenteral administration of metal-containing nanobiocomposite // Bjul. VSNC SO RAMN. – 2012. – N 2 (84). – P. 114–117. (in Russian)
3. Войткова В.В., Дубровина В.И., Колесникова О.Б. и др. Методические рекомендации по выявлению фосфатидилсерина на лимфоцитах крови мышей с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II. – Иркутск, 2010. – 16 с.

Voytkova V.V., Dubrovina V.I., Kolesnikova O.B. et al. Guideline on the detection of phosphatidyl serine on lymphocytes of mice with use of flow cytometer BD FACSCanto™ II. – Irkutsk, 2010. – 16 p. (in Russian)

3. Дубровина В.И., Витязева С.А., Коновалова Ж.А., Старовойтова Т.П. и др. Сравнительная характеристика действия наноструктурированных аргенто-1-винил-1,2,4-триазола, аргентогалактоманнана и кобальтарабиногалактана на иммунную реакцию организма экспериментальных животных // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2012. – № 3 (12). – С. 31–37.

Dubrovina V.I., Vityazeva S.A., Konovalova Zh.A., Starovoytova T.P. et al. Comparative analysis of effect of nanostructured argento-1-vinyl-1,2,4-triazole, argentogalactomannan and cobaltarabinogalactan on the immune reaction of on organism of experimental animals // Nanotehnologii i ohrana zdorov'ja. – 2012. – N 3 (12). – P. 31–37. (in Russian)

4. Кондратьева И.А., Ярилин А.А., Егорова С.Г. и др. Практикум по иммунологии: Учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений; 2-е изд-е / Под ред. И.А. Кондратьевой, А.А. Ярилина. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 272 с.

Kondratjeva I.A., Yarilin A.A., Egorova S.G. et al. Practical course of immunology: Student training manual; 2nd ed. / Ed. by I.A. Kondratjeva, A.A. Yarilina. – Moscow: Akademiya, 2004. – 272 p. (in Russian)

5. Лесничая М.В., Александрова Г.П., Феоктистова Л.П., Сапожников А.Н. и др. Серебросодержащие наноконкомпозиты на основе галактоманнана и каррагинана: синтез, строение, антимикробные свойства // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2010. – № 12. – С. 2323–2328.

Lesnichaya M.V., Aleksandrova G.P., Feoktistova L.P., Sapozhnikov A.N. et al. Silver-containing nanocomposite associated with galactomannan and carrageenan: synthesis, structure, antimicrobial properties // Izvestiya Akademii nauk. Seriya himicheskaja. – 2010. – N 12. – P. 2323–2328. (in Russian)

6. Поздняков А.С. Полифункциональные (co) полимеры 1-винил-1,2,4-триазола и наноконкомпозиты на их основе: автореф. дис. ... канд. хим. наук. – Иркутск, 2011. – 22 с.

Pozdnyakov A.S. Polyfunctional (co)polymers of 1-vinyl-1,2,4-triazole and nanocomposites associated with them: abstract of dissertation of Candidate of Chemical Sciences. – Irkutsk, 2011. – 22 p. (in Russian)

Сведения об авторах

Войткова Валентина Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патофизиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока (664047, г. Иркутск, ул. Трилисера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35; e-mail: vvoitkova@mail.ru)

Дубровина Валентина Ивановна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией патофизиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Корытов Константин Михайлович – младший научный сотрудник лаборатории патофизиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Витязева Светлана Александровна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела микробиологии чумы Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Старовойтова Татьяна Пантелеевна – научный сотрудник лаборатории патофизиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Балахонов Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, директор Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Information about the authors

Voytkova Valentina Vladimirovna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer of the Laboratory of Pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East (Trilisera str., 78, Irkutsk, 664047; tel.: +7 (3952) 22-01-35; e-mail: vvoitkova@mail.ru)

Dubrovina Valentina Ivanovna – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East

Korytov Konstantin Mikhaylovich – Junior Research Officer of the Laboratory of pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East

Vityazeva Svetlana Aleksandrovna – Candidate of Medical Sciences, Research Officer of the Laboratory of Plague Microbiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East

Starovoytova Tatiana Panteleevna – Research Officer of the Laboratory of Pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East

Balakhonov Sergey Vladimirovich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East