

Содержание γ -глобулинов (г/л)

Группы животных	До операции	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	30-е сутки	60-е сутки	180-е сутки
Сравнения	7,61±0,30	7,59±1,46	9,52±0,54	10,83±0,61	8,91±0,48+	9,84±0,64	15,57±0,55***
Опытная	6,96±0,33	7,27±0,26	6,85±0,53	9,77±1,12	7,12±0,39	6,96±0,68	11,49±1,58*

Примечание. Статистическая значимость различий с дооперационными значениями: *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001.

мое различие между животными разных групп наблюдалось на 10-е (p=0,008), 30-е (p=0,02) и 60-е (p=0,015) сутки. Фракция γ -глобулинов содержит преимущественно IgG, и её повышение отражает мобилизацию специфических иммунных защитных механизмов.

ВЫВОДЫ

1. На фоне неизменного уровня общего белка после перенесённой травмы и развития процесса регенерации мы наблюдали характерную для ответа острой фазы диспротеинемию — изменение соотношения белковых фракций крови. Выявлено две «волны» реакции. Первая развивалась к 5-м суткам и характеризовалась снижением уровня альбуминов и повышением содержания α - и β_2 -глобулинов, эта реакция затухала в опытной группе раньше, чем в группе сравнения. Вторая развивалась к 180-м суткам и характеризовалась повышением концентрации β_2 - и γ -глобулинов.

2. Наблюдаемые сдвиги соответствовали фазам раннего неспецифического ответа, включающего усиление синтеза положительных и снижение образования отрицательных реактантов острой фазы воспаления печенью под влиянием цитокинов, а также более позднему специфическому адаптивному иммунному ответу.

3. В целом интенсивность реакций в опытной группе была меньше, чем в группе сравнения. Более продолжительное снижение уровня альбуминов и выраженный рост содержания γ -глобулинов в группе сравнения свидетельствуют о меньшем повреждающем стимуле при использовании имплантатов с покрытием нитридами титана и гафния.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ключевский В.В.* Хирургия повреждений. — Ярославль, Рыбинск, 2004. — 784 с.
2. *Лазарев А.Ф., Солод Э.И., Ахтямов И.Ф.* Рациональный остеосинтез. — Казань: Скрипта, 2010. — 256 с.
3. *Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T.* Foreign body reaction to biomaterials // *Semin. Immunol.* — 2008. — Vol. 20, N 2. — P. 86–100.
4. *Gabay C., Kushner I.* Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation // *NEJM.* — 1999. — Vol. 340. — P. 448–454.
5. *Gruys E., Toussaint M.J.M., Niewold T.A., Koopmans S.J.* Acute phase reaction and acute phase proteins // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* — 2005. — Vol. 6, N 11. — P. 1045–1056.
6. *O'Connell T.X., Horita T.J., Kasravi B.* Understanding and interpreting serum protein electrophoresis // *Am. Fam. Physician.* — 2005. — Vol. 71, N 1. — P. 105–112.
7. *Toussaint M.J.M.* Acute phase protein in different species measured as a tool to assess animal health // *Eur. Coll. Report.* — 2000. — Vol. 1. — P. 1–3.

УДК 612.017.1: 612.084: 616-053.3-053.1-022: 616.9-092.9

E06

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АНТИГЕНОВ *TOXOPLASMA GONDII* В ПРЕНАТАЛЬНОМ И РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДАХ

Татьяна Фёдоровна Соколова, Дмитрий Георгиевич Новиков*, Антон Васильевич Индутный

Омская государственная медицинская академия

Реферат

Цель. Определить особенности иммунного статуса в пренатальном и раннем постнатальном периодах при воздействии антигенов *Toxoplasma Gondii* (*T. gondii*).

Методы. Исследование проводили на потомстве белых крыс линии **Wistar, рождённых от самок, сенсibilизированных** в III триместре беременности корпускулярным антигеном *T. gondii*, — первая группа (n=96), а также на особях, которым данный антиген вводили в возрасте 1 день, — вторая группа (n=103). Группу контроля составили интактные крысы. На 60-е сутки после рождения проводили гематологический анализ, оценивали количество антителообразующих клеток и клеток CD3⁺ у исследуемых животных.

Результаты. Количество нейтрофилов в крови крыс первой группы было в 1,9 раза выше, чем у особей второй группы. Содержание эозинофилов было в 1,4 раза ниже в первой группе (p=0,01) и в 2 раза ниже во второй группе (по сравнению с группой контроля, p=0,002). Одновременно количество лимфоцитов у животных из первой группы было сопоставимо со значениями в группе контроля, а во второй группе значение этого показателя оказалось в 1,4 раза ниже контроля (p=0,04). Вместе с тем в обеих группах было отмечено снижение уровня лимфоцитов CD3⁺

и антителообразующих клеток в крови и селезёнке, носившее более выраженный характер во второй группе. У потомства крыс, рождённого от самок, sensibilizированных корпускулярным антигеном *T. gondii* в III триместре беременности, отмечены лимфаденопатия, дисплазия вилочковой железы, уменьшение количества Т-лимфоцитов в селезёнке и крови, снижение показателей гуморального иммунитета.

Вывод. Последствия действия корпускулярного антигена *T. gondii* на крыс в перинатальном периоде проявляются вторичным иммунодефицитным состоянием, сохраняющимся на 60-е сутки онтогенеза.

Ключевые слова: *Toxoplasma gondii*, иммунный ответ, пренатальный период, ранний постнатальный период, эксперименты на живых организмах.

INFLUENCE OF TOXOPLASMA GONDII ANTIGENS ON FEATURES OF IMMUNE STATUS AT PRENATAL AND EARLY POSTNATAL PERIODS: EXPERIMENTAL STUDY

T.F. Sokolova, D.G. Novikov, A.V. Indutny. Omsk State Medical Academy, Omsk, Russia. **Aim.** To detect the features of immune status at prenatal and early postnatal periods under the influence of *Toxoplasma gondii* antigens. **Methods.** The experimental study was performed on Wistar white rats, who were the offspring of the female rats who were sensitized by *T. gondii* corpuscular antigen during the III trimester of pregnancy – group 1 (n=96) and on animals who were administered *T. gondii* corpuscular antigen at first day of life – group 2 (n=103). Control group consisted of intact rats. Common blood test, levels of antibody-forming cells and CD3⁺ cells were assessed at 60 day after birth. **Results.** Neutrophil blood count was 1.9 times higher in the group 1 rats compared to group 2. Eosinophil blood count was 1.4 times lower in the group 1 compared to control group (p=0.01), and 2 times lower in the group 2 compared to control group (p=0.002). At the same time, lymphocyte count was comparable in the group 1 rats and control group, while it was 1.4 times lower in the group 2 compared to control group (p=0.04). Together with that, there was a reduction of CD3⁺ cells and antibody-forming cells in blood and spleen, which was more marked in the 2nd group. Lymphadenopathy, thymus dysgenesis, reduced blood and spleen T-cells levels, low humeral immunity were found in Wistar white rats, who were the offspring of the female rats who were sensitized by *T. gondii* corpuscular antigen during the III trimester of pregnancy. **Conclusion.** The influence *T. gondii* corpuscular antigen on rats during perinatal period results in secondary immunodeficiency, persisting at 60 day of life.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, immune response, prenatal period, early postnatal period, animal experiments.

Токсоплазмоз — одна из причин врождённых пороков развития, формирования иммунологической патологии в раннем и отдалённом периодах детства [4]. Развитие токсоплазмоза чаще всего происходит на фоне иммуносупрессии и определяется состоянием Т-клеточного звена иммунитета [1]. К настоящему времени существуют данные о преобладании типа Th1 иммунного ответа при развитии токсоплазмоза [7]. Механизм такой поляризации тесно связан с синтезом интерлейкина-12, обусловленным активацией эндосомальных рецепторов TLR-II и -12 в дендритных клетках [9]. Подобный процесс обеспечивает активацию клеток CD4⁺ и продукции ими интерферона γ , необходимого для NO-зависимого киллинга *Toxoplasma Gondii* (*T. gondii*) в паразитофорных везикулах макрофагов [9]. Важная роль в синтезе интерферона γ принадлежит также нейтрофильным лейкоцитам, однако механизм стимуляции его образования до сих пор остаётся невыясненным [8, 9]. У детей, рождённых от женщин с токсоплазмозом, регистрируют сочетанные иммунные нарушения в виде снижения количества фагоцитирующих клеток, уменьшения показателей Т-клеточного звена иммунитета с недостаточностью абсолютного содержания клеток CD3⁺ и CD4⁺ [1]. Однако связь между пренатальным и ранним постнатальным воздействием антигенов (АГ) *T. gondii* на органы иммунной системы плода и новорождённого и их функционированием в постнатальном периоде изучены недостаточно хорошо.

Цель исследования — определить особенности иммунного статуса в пренатальном и раннем постнатальном периодах при воздействии АГ *T. gondii*.

Экспериментальное исследование проведено на потомстве белых крыс линии Wistar, составившем две исследуемые и одну контрольную

группы. В каждой группе было проведено две серии эксперимента. В исследуемую первую группу были включены крысята (n=52), рождённые от самок, которым в III триместре беременности был введён корпускулярный АГ *T. gondii* (ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва) в дозе 1×10^7 клеток внутривенно (в/в). Во второй группе АГ *T. gondii* в дозе 1×10^5 клеток был введён новорождённым крыскам в возрасте 1 день (n=55). В группу контроля были включены интактные животные, сопоставимые по полу и возрасту (n=62).

Во второй серии эксперимента за 5 сут до эвтаназии животным из исследуемых и контрольной групп были введены эритроциты барана в количестве 3×10^9 клеток (количество животных в первой, второй и контрольной группах составило 44, 48 и 55 соответственно).

Эксперимент выполняли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС). Взятие биологического материала (кровь, вилочковая железа, селезёнка, брыжеечные лимфатические узлы) проводили на 60-е сутки после рождения животных. Гематологический анализ выполняли с использованием анализатора Ex-cell-22 (США). Число клеток CD3⁺ в крови и стандартной взвеси спленоцитов подсчитывали на проточном цитометре (Cytomics FC500, Beckman Coulter, США). Количество антителообразующих клеток, секретирующих иммуноглобулин М к эритроцитам барана, в селезёнке определяли на пике иммунного ответа через 5 дней после иммунизации крыс при помощи прямого метода локального гемолиза по Cunningham [2].

Статистическую оценку осуществляли с помощью параметрических и непараметрических методов. Различия оценивали как значимые при $p < 0,05$.

Показатели системы крови и иммунитета у потомства крыс после введения антигена *T. gondii* в пренатальном и раннем постнатальном периодах онтогенеза

Показатель	Группа контроля	Экспериментальные группы	
		Первая группа	Вторая группа
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	5,3 \pm 0,4	7,5 \pm 0,3*	7,7 \pm 0,4*
Нейтрофилы, %	19,7 \pm 1,4	22,8 \pm 3,3	42,9 \pm 3,3*,**
Моноциты, %	6,2 (4,2; 7,2)	5,4 (5,1; 7,2)	5,6 (5,2; 7,4)
Эозинофилы, %	2,4 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1*	1,2 \pm 0,1*,**
Базофилы, %	1,7 \pm 0,2	2,3 \pm 0,8	2,2 \pm 0,4
Лимфоциты, %	68,9 \pm 1,8	65,3 \pm 2,0	49,7 \pm 2,4*,**
Т-лимфоциты (CD3 ⁺) в крови, %	95,9 \pm 0,8	76,6 \pm 2,0*	83,1 \pm 0,6*,**
Т-лимфоциты (CD3 ⁺) в селезёнке, %	81,3 \pm 1,9	62,9 \pm 2,9*	69,3 \pm 0,9*,**
Антителообразующие клетки, $\times 10^3$	58,1 \pm 3,2	41,9 \pm 2,9*	46,7 \pm 2,3*

Примечание: $M \pm m$ – для нормального распределения; Me (1-й; 3-й квартили) – для распределения, отличающегося от нормального; статистическая значимость различий ($p < 0,05$): *по отношению к группе контроля, **между экспериментальными группами.

В первой серии эксперимента было показано, что потомство крыс, перинатальное развитие которых происходило в условиях введения АГ *T. gondii*, оказалось менее жизнеспособным, чем в группе контроля: в течение 3 сут после рождения в первой и второй группах погибли 5 и 6 животных соответственно.

Во второй серии эксперимента также наблюдалась гибель части потомства: 3 животных в первой группе и 1 животное во второй группе погибли на 1-3-и сутки. Вероятно, гибель животных связана со срывом функциональных возможностей незрелой иммунной системы в результате воздействия высоких доз АГ.

Как у животных, рождённых от сенсибилизированных АГ *T. gondii* самок, так и у крысят, которым вводили АГ после рождения, в 2-месячном возрасте при ревизии брюшной полости было выявлено увеличение брыжеечных лимфатических узлов, образующих конгломераты в виде тяжей, расположенных вдоль кишечника. Селезёнка животных в первой и второй сериях экспериментов имела зернистую структуру, визуализировались фолликулы. Масса вилочковой железы у потомства сенсибилизированных самок была снижена (173,9 \pm 9,8 против 244,3 \pm 11,7 мг в группе контроля, $p=0,002$), а у крысят, которым АГ *T. gondii* был введён после рождения, не различалась с контролем.

Введение АГ *T. gondii* экспериментальным животным как в пренатальном, так и в раннем постнатальном периодах сопровождалось отсроченными изменениями показателей системы иммунитета 2-месячных крыс (табл. 1).

Количество лейкоцитов у потомства крыс, развитие которых происходило в условиях внутриутробного действия АГ *T. gondii*, было в 1,4 раза выше, чем в группе контроля ($p=0,009$).

Аналогичные отсроченные изменения зарегистрированы и у крысят, которым вводили АГ *T. gondii* после рождения. Количество лейкоцитов у них превышало значения в группе контроля в

1,5 раза ($p=0,04$), что было обусловлено 2,2-кратным увеличением количества нейтрофилов ($p=0,001$). Количество последних в крови крысят из второй группы было в 1,9 раза выше, чем в первой группе. При этом число моноцитов и базофилов в обеих экспериментальных группах соответствовало значениям в группе контроля, количество эозинофилов было в 1,4 раза (первая группа, $p=0,01$) и 2 раза (вторая группа, $p=0,002$) ниже в сравнении с группой контроля.

Уменьшение содержания эозинофилов в крови отражает снижение резистентности организма к воздействию факторов внешней среды, что в сочетании с лейкоцитозом, обусловленным повышением количества нейтрофилов, является важным признаком активного воспаления. Полученные результаты согласуются с данными недавних исследований, показавших значительную роль нейтрофилов в синтезе интерферона γ , необходимого для реализации врождённого иммунитета к *T. gondii* [9].

Количество лимфоцитов в первой группе было сопоставимо со значениями, полученными в группе контроля. В отличие от этого при введении АГ *T. gondii* после рождения во второй группе регистрировалась относительная лимфопения с уменьшением показателей в 1,4 раза ($p=0,04$) по сравнению с группой контроля и в 1,3 раза ($p=0,04$) по сравнению с первой группой.

При оценке популяции Т-клеток в крови и селезёнке у крыс из первой группы было выявлено уменьшение количества лимфоцитов CD3⁺ в крови на 20,1% ($p=0,003$) и в селезёнке на 22,6% ($p=0,0004$, см. табл. 1) в сравнении с группой контроля. При исследовании иммунологических показателей у животных второй группы отмечено уменьшение количества Т-лимфоцитов крови на 13,3% ($p=0,01$) и числа Т-лимфоцитов селезёнки на 14,8% ($p=0,043$) по сравнению с контрольными величинами. Следует отметить, что снижение количества лимфоцитов CD3⁺ в крови и селезёнке было более значимо в первой группе – при внут-

риутробном действии АГ *T. gondii*, составляя в крови 92,2%, в селезёнке — 90,8% показателей во второй группе.

При оценке влияния АГ *T. gondii*, введённого в пренатальном и раннем постнатальном периодах, на гуморальный иммунный ответ к эритроцитам барана обнаружена депрессия специфического антителообразования, что проявлялось снижением числа антителообразующих клеток на пике первичного иммунного ответа у крысят первой группы на 27,9% ($p=0,03$). Количество антителообразующих клеток у крысят второй группы было снижено на 19,6% ($p=0,04$).

Последствия действия АГ *T. gondii* на иммунную систему плода и новорождённого зарегистрированы у крысят на 60-е сутки постнатального онтогенеза. Они проявлялись лимфаденопатией, дисплазией вилочковой железы, структурными нарушениями селезёнки и уменьшением количества Т-лимфоцитов в ней, Т-лимфопенией, дисфункцией гуморального звена иммунитета с недостаточной генерацией антителообразующих клеток в ответ на тимусзависимые АГ. Аналогичные изменения иммунного гомеостаза (атрофия вилочковой железы, сочетанные иммунные нарушения в виде снижения количества фагоцитирующих клеток, уменьшения показателей Т-клеточного звена иммунитета с недостаточностью абсолютного содержания клеток CD3⁺ и CD4⁺) выявлены у детей, рождённых от женщин с токсоплазменной инфекцией [1].

Отсроченные нарушения неспецифических факторов защиты и адаптивного иммунитета у крысят при введении им АГ *T. gondii* в первые сутки после рождения реализовались нейтрофильным лейкоцитозом, эозинопенией, лимфопенией, депрессией клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Следует отметить отсутствие дисплазии вилочковой железы у крысят при воздействии АГ *T. gondii* в пренатальном периоде, а также менее выраженное, с различием 7–9%, снижение количества Т-лимфоцитов в крови и селезёнке.

Выявленные нарушения клеточного и гуморального звеньев иммунитета, сохраняющиеся длительное время после рождения, можно охарактеризовать как стадию декомпенсации адаптационных реакций иммунной системы и развитие вторичного иммунодефицитного состояния у крысят, подвергшихся действию АГ *T. gondii* как в пренатальном, так и в раннем постнатальном периодах. Подобные сдвиги в целом являются стереотипным ответом на введение АГ, проявляющимся поляризацией иммунного ответа по Th1-типу и завершающимся развитием иммунологической толерантности к АГ у плода [5] и новорождённого [6].

Обнаруженные нами отличия морфофунк-

циональных характеристик иммунной системы у потомства крыс при воздействии АГ *T. gondii* в пренатальном и раннем постнатальном периодах, вероятно, связаны как с разной степенью зрелости иммунитета плода и новорождённого, так и с особенностями влияния данного АГ [3].

ВЫВОДЫ

1. Последствия действия антигена *T. gondii* на плод и новорождённую крысу проявляются вторичным иммунодефицитным состоянием, сохраняющимся на 60-е сутки онтогенеза.

2. Нарушения иммунитета у потомства крыс, рождённого от сенсibilизированных антигеном *T. gondii* в III триместре беременности самок, характеризуются лимфаденопатией, дисплазией вилочковой железы, уменьшением количества Т-лимфоцитов в селезёнке и крови, снижением гуморального иммунитета.

3. При введении антигена *T. gondii* в раннем постнатальном периоде отдалённые последствия его действия проявляются нейтрофильным лейкоцитозом, эозинопенией, лимфопенией, а также менее выраженными, чем при введении антигена *T. gondii* в пренатальном периоде, проявлениями депрессии клеточного и гуморально-го звеньев иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барычева Л.Ю. Клинические и иммунологические особенности врождённого токсоплазмоза // Рос. вестн. перинатол. и педиатр. — 2004. — Т. 29, №2. — С. 55–59.
2. Лимфоциты: методы. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. — М.: Мир, 1990. — 393 с.
3. Титов Л.П., Кирильчик Е.Ю., Канаикова Т.А. Особенности строения, развития и функционирования иммунной системы детского организма // Мед. новости. — 2009. — №5. — С. 7–16.
4. Chaudhry S.A., Gad N., Koren G. Toxoplasmosis and pregnancy // Can. Fam. Physician. — 2014. — Vol. 60, N 4. — P. 334–336.
5. Dietert R.R., Piepenbrink M.S. The managed immune system: protecting the womb to delay the tomb // Hum. Exp. Toxicol. — 2008. — Vol. 27, N 2. — P. 129–134.
6. Lisciandro J.G., van den Biggelaar A.H. Neonatal immune function and inflammatory illnesses in later life: lessons to be learnt from the developing world? // Clin. Exp. Allergy. — 2010. — Vol. 40, N 12. — P. 1719–1731.
7. Raetz M., Hwang S.H., Wilhelm C.L. et al. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection // Nat. Immunol. — 2013. — Vol. 14, N 2. — P. 136–142.
8. Sturge C.R. TLR-independent neutrophil-derived IFN γ is important for host resistance to intracellular pathogens // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2013. — Vol. 110. — P. 10 711–10 716.
9. Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection // Nat. Rev. Immunol. — 2014. Vol. 14, N 2. — P. 109–121.