

ТОПОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВАКЦИННОМ ПРОЦЕССЕ

БУГОРКОВА С.А., КЛЮЕВА С.Н.

TOPOGRAPHICAL FEATURES STATE OF ERYTHROCYTE MEMBRANES BLOOD EXPERIMENTAL VACCINES PROCESS

BUGORKOVA S.A., KLUEVA S.N.

Лаборатория патоморфологии (зав. лабораторией – д.м.н. С.А. Бугоркова) ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов.

Разработка высокоэффективных и безопасных вакцин против чумы и туляремии повышает требования к точности и информативности методов оценки безопасности разрабатываемых препаратов. Цель исследования – охарактеризовать поверхностную архитектуру мембран эритроцитов (ПАМЭ) крови мышей, иммунизированных культурами вакцинных штаммов *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ и *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ в различные сроки иммуногенеза.

У иммунизированных животных регистрировали уменьшение количества дискоцитов на фоне увеличения числа трансформированных форм клеток. Выраженность изменений ПАМЭ в первые сутки эксперимента находилась в прямой зависимости от иммунизирующей дозы вакцинных штаммов чумного и туляремии микробов. В процессе иммуногенеза изменения ПАМЭ заключались в планомерном снижении количества трансформированных клеток в период с 3-х по 21-е сутки наблюдения. На гистограммах кривой сечения клеток у всех иммунизированных животных отмечали более глубокую складчатость мембранной поверхности, выраженную в ранние сроки иммуногенеза и последующее сглаживание контуров эритроцитов, что укладывается в картину частичного восстановления нарушенной структуры мембраны и метаболизма клетки.

Таким образом, в норме система гемопозза реагирует на внешнее воздействие активным и быстрым восстановлением равновесия внутри себя, что позволяет рассматривать возможность учета состояния ПАМЭ для характеристики адаптационно-компенсаторных реакций макроорганизма при вакцинном процессе.

Ключевые слова: эритроцит, вакцинный процесс, атомно-силовая микроскопия

The development of highly effective and safe

vaccines against plague and tularemia increases the demands on the accuracy and informativeness of safety assessment methods developed drugs. The purpose of research - to characterize the surface architecture of erythrocyte membranes (PAME) in the blood of mice immunized with vaccine strains cultures *Francisella tularensis* 15 lines NIEG and *Yersinia pestis* EV line NIEG at different times.

The immunized animals were also registered a decrease in the number of discocytes increasing the number of transformed forms of cells. The severity of the changes PIFFA on the first day of the experiment were in direct relation to the immunizing dose of the vaccine strains of the plague and tularemia microbe. In the process of immunogenesis changes PIFFA was planned reduction in the number of transformed cells in the period from 3 to 21 days of observation. On the histogram curve of the cross section of the cells in all immunized animals were observed deeper wrinkling of the membrane surface, expressed in the early stages of immunogenesis and subsequent smoothing of the contours of erythrocytes that matches the picture of a partial restoration of damaged membrane structure and cell metabolism.

Thus, in normal hematopoietic system reacts to external influence actively and quickly restore equilibrium within himself, that allows us to consider the possibility of taking into account the state of PAME to characterize the adaptive-compensatory reactions of microorganism with the vaccine process.

Key words: erythrocyte, the vaccine process, atomic force microscopy

Введение. Эритроциты являются важнейшими клеточными компонентами крови, от морфофункционального состояния которых во многом зависит осуществление ее защитной и транспортной функций, гуморальная регуляция адаптационных процессов в норме и патологии, целый ряд других характеристик макроорганизма. Однонаправленный характер изменений поверхностной архитектуры эритроцитов при различных патологических состояниях свидетельствует об универсальности ответа перифериче-

ского звена эритрона независимо от механизма воздействия. Анализ изменений поверхностной архитектуры мембраны эритроцитов (ПАМЭ) при различных физиологических и патологических состояниях представляет интерес, поскольку это один из параметров этих клеток, отражающий уровень клеточного гемолиза. Нарушение структуры мембран и метаболизма эритроцитов проявляется нарастанием полиморфизма клеток в популяции и появлением трансформированных форм [1, 2]. Известно, что любые изменения морфологической картины эритроцитарного ростка при различных заболеваниях приводят к нарастанию гипоксии и, в некоторой степени, определяют характер течения патологического процесса [3, 4].

Благодаря внедрению современных методов исследования, таких как сканирующая микроскопия, и в частности атомно-силовая микроскопия (АСМ), впервые удалось описать рельеф поверхности различных клеток макроорганизма [5, 6].

Было установлено, что топография клеточной поверхности индивидуальна для каждого вида клеток, но эта характеристика достаточно изменчива при различных физиологических состояниях клетки, таких как изменение фазы клеточного цикла [7]. Особенно выраженные нарушения поверхностной структуры клеток происходят при различных патологических процессах и интоксикациях [8, 9, 10]. Благодаря этому формируется важное направление в медицине, связанное с изучением топографии клеточной поверхности.

Вакцинация остается одним из эффективных средств борьбы с инфекционными заболеваниями, в том числе и с особо опасными инфекциями, такими как чума и туляремия. Существующие живые вакцины против этих инфекций в силу своей реактогенности вызывают в макроорганизме сложный комплекс нейрогуморальных, метаболических и морфологических сдвигов, строгий учет которых позволяет характеризовать безопасность как уже имеющихся, так и вновь создаваемых препаратов для специфической профилактики особо опасных инфекций. Разработка высокоэффективных и безопасных вакцин против чумы и туляремии, в том числе, препаратов на основе протективных антигенов этих микроорганизмов, повышает требования к точности и информативности морфологического заключения по безопасности этих препаратов.

Цель исследования - охарактеризовать ПАМЭ крови мышей, иммунизированных культурами вакцинных штаммов *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ и *Yersinia pestis EV* линии НИИЭГ в различные сроки иммуногенеза.

Материал и методы исследования. Эксперименты проводились на здоровом поголовье белых мышей линии BALB/c (95 особей). Рацион

питания животных был стандартным сбалансированным. Дальнейшие исследования выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Министерства Здравоохранения СССР от 12.08.1977 года. Животных (по 15 мышей в группе) с массой тела 18-20 г подкожно в область правого бедра иммунизировали: *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ - в дозах 50 м.к. (1-я группа), 5×10^2 м.к. (2-я группа), 5×10^3 м.к. (3-я группа); *Yersinia pestis EV* линии НИИЭГ в дозах: 1×10^2 м.к. (4-я группа), 1×10^5 м.к. (5-я группа) и 1×10^7 м.к. (6-я группа). Наблюдение за животными осуществляли в течение 21-го дня, вывода животных из эксперимента на 1, 3, 7, 14, 21 сутки посредством декапитации. Контрольным животным (5 особей) в условиях аналогичных опытным подкожно вводили 0,2 мл физиологического раствора (интактный контроль).

Для исследования кровь от декапитированных животных собирали в пробирки с 2,5 % раствором глутаральдегида в соотношении 1:3. Материал фиксировали в течение 2,5 ч. Эритроциты осаждали центрифугированием при 3000 оборотах в течение 5 мин. Клетки дважды отмывали фосфатным буфером (pH 7,4) при тех же условиях центрифугирования. Из полученной взвеси клеток путем десятикратного разведения дистиллированной водой готовили суспензию эритроцитов с концентрацией 3×10^6 кл./л. Контроль абсолютного количества клеток в конечной пробе осуществляли подсчетом эритроцитов в камере Горяева, применяя световую микроскопию и увеличение $\times 400$. Полученный материал объемом 1-2 мкл наносили на стекла (20×20 мм²) и высушивали при комнатной температуре. Анализ проб выполняли с использованием сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия) с кантилеверами для режима прерывистого контакта (полуконтактного) NSG01 (NT-MDT, Россия), обладающих резонансной частотой 120 кГц и константой жесткости 5,5 Н/м. В полуконтактном режиме на больших полях сканирования (50×50 мкм) анализу подвергали поверхность отдельно лежащих эритроцитов в десятикратном повторе ($n = 50$). Полученный материал фотодокументировали. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета компьютерных программ "Microsoft Excel 2010". Данные представлены в виде $M \pm m$ десяти повторов. Различия между значениями количества трансформированных форм в различных группах по отношению к контрольной группе оценивали как достоверные при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В крови интактных мышей абсолютное большинство эритроцитов (до 97%) было представле-

Таблица.

Количество трансформированных форм эритроцитов у иммунизированных животных по данным АСМ

Препарат	Иммунизи- рующая доза (микробные клетки)	Сроки наблюдения/количество клеток (%)				
		1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
<i>F.tularensis</i> 15 НИИЭГ	50	19,0±5,37 *	10,6±4,36 *	9,2±2,72*	7,2±1,17	1,4±1,02
	5x102	27,0±6,54*	20,4±6,09*	10,2±4,26 *	7,2±2,64	2,6±1,36
	5x103	24,0±6,20 *	25,0±4,19*	7,6±1,02	7,4±2,06	4,0±1,09
<i>Y.pestis EV</i> НИИЭГ	100	28,6±14,05*	8,0±1,89*	5,2±1,72	9,2±1,72*	7,0±2,61
	1x105	30,0±7,13*	10,0±2,28*	6,0±1,67	9,4±6,47*	8,0±3,74*
	1x107	35,0±6,60*	15,2±4,35*	12,7±2,83	7,6±2,33	14,8±2,99*
Интактный контроль	-	3,8±0,98				
Условные обозначения: * Достоверность результатов по отношению к интактному контролю p<0,05						

но двояковогнутыми дискоцитами (ДД), с гладкой поверхностью, диаметром 5,0-6,0 мкм. Известно, что ДД обладают высокой способностью к деформации и эластичностью, что обусловлено особым метаболизмом клетки, изменения которого при различных патологических состояниях влекут за собой снижение или утрату этих способностей эритроцитами [5]. У интактных мышей не более 4 % эритроцитов приходилось на клетки, имеющие трансформированную форму (эхиноциты с единичными или множественными выростами).

Динамика появления и накопления клеток с изменениями ПАМЭ у иммунизированных животных представлена в таблице. Изменения ПАМЭ крови иммунизированных животных регистрировали по уменьшению количества ДД на фоне увеличения числа трансформированных форм клеток. Выраженность изменений ПАМЭ в первые сутки эксперимента находилась в прямой зависимости от иммунизирующей дозы вакцинных штаммов чумного и туляреминого микробов. В процессе иммуногенеза изменения ПАМЭ во всех экспериментальных группах заключались в планомерном снижении количества трансформированных клеток в период с 3-х по 21-е сутки наблюдения. Реакция мембраны любой клетки является следствием нарушений внутриклеточного обмена и возникает при любых внешних физико-химических, иммунологических или токсических воздействиях. Результатом такого воздействия становится возникновение различных обратимых и необратимых трансформаций поверхностной структуры клетки [1, 5, 11].

Изменение метаболизма клеток у подопытных мышей проявлялось нарушениями ПАМЭ в 1-е сутки после иммунизации во всех группах.

Так, отмечали снижение количества нормальных форм эритроцитов, доходившее в 6-ой группе до 65 % в сравнении с интактными животными (96 %). Одновременно к 1-м суткам наблюдали повышение количества трансформированных форм клеток (эхиноциты со множественными и единичными выростами, куполообразные, каплевидные). Количество таких клеток увеличивалось во всех группах от 19 до 35 %, что в 6-9 раз превышало аналогичный показатель в группе интактных мышей (3,8 %).

Среди субпопуляции трансформированных эритроцитов встречались как обратимо измененные переходные формы (плоские диски, эхиноциты с одним выростом, эхиноциты с множественными выростами), так и необратимо измененные (куполообразные, сферические, каплевидные), количество последних было выше в группах животных, иммунизированных *Y. pestis EV*.

К 3-м суткам наметилась тенденция снижения количества трансформированных форм эритроцитов во всех группах, хотя в 3-ей и 6-ой группах еще сохранялись достаточно высокие показатели эхиноцитов со множественными и единичными выростами, более того в 6-ой группе среди измененных форм чаще встречались необратимо трансформированные куполообразные и каплеобразные (дакриоциты) клетки.

В период с 7-х по 14-е сутки сохранялась тенденция снижения количества трансформированных форм эритроцитов, их количество не превышало 6-10 %. К 21-м суткам иммуногенеза в группах мышей, иммунизированных *F.tularensis* 15 НИИЭГ, количество трансформированных форм достоверно не превышало показатель у интактных животных, а у животных 4-ой группы, иммунизи-



Рис. 1. Анализ рельефа эритроцитов в эксперименте. Вертикальный профиль клетки.

ванных *Y.pestis* EV, приближалось к контрольным значениям. Исключением была реакция животных в 6-ой группе, в которой иммунизация мышей проводилась достаточно высокой дозой - 1×10^7 м.к. вакцинного штамма чумного микроба. В этой группе регистрировали более 35 % необратимо трансформированных форм эритроцитов в ранние сроки наблюдения, а к 21-м суткам количество измененных форм почти в 4 раза превышало аналогичный показатель в интактном контроле, что возможно, обусловлено некоторым снижением восстановительной способности системы гемопоэза на фоне резкого увеличения количества необратимо трансформированных форм эритроцитов.

Среди измененных форм эритроцитов, количество которых варьировало на протяжении периода наблюдения, на долю эхиноцитов со множественными выростами приходилось до $65,2 \pm 0,32$ % клеток. Доля эхиноцитов с единичными выростами составляла $26,5 \pm 0,17$ % клеток, доля куполообразных форм не превышала $4,9 \pm 0,92$ % клеток в общем пуле трансформированных форм. На

прочие необратимо трансформированные формы приходилось до $3,4 \pm 0,97$ % клеток.

Изменение диаметра трансформированных эритроцитов колебалось от 5,0 мкм до 7,2 мкм. Анализ гистограмм ПАМЭ нормальных эритроцитов и измененных форм показал, что у неизмененных форм типичный двояковогнутый профиль клетки характеризовали на кривой сечения две равномерные синусоиды, в то время, как структура мембранной поверхности измененных форм обладала выраженной складчатостью. Любое нарушение в рельефе эритроцита отражалось на изменении профиля клетки, представленного в гистограммах (рис. 1, 2, 3). У трансформированных клеток полностью искажался рельеф поверхности, отсутствовала характерная двояковогнутость, чаще за счет расположения возвышений в центре впадины дискоцита. В основном выросты имели уплощенную коническую форму с округлой вершиной.

Следует отметить, независимо от иммунизирующего препарата (вакцинный штамм туляремиального или чумного микроба) общие

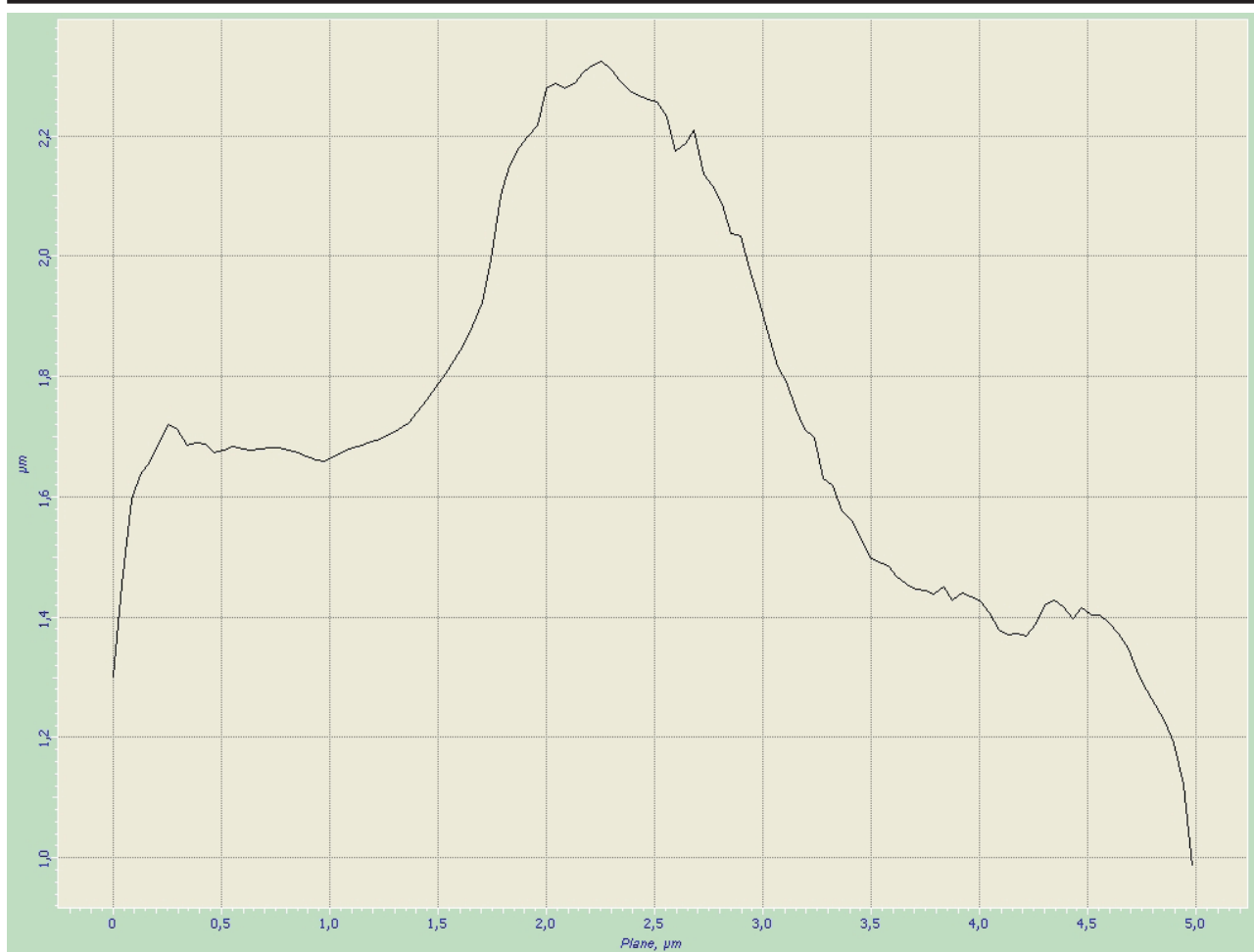


Рис. 2. Анализ рельефа эритроцитов в эксперименте. Вертикальный профиль клетки.

закономерности реагирования мембраны эритроцита разворачивались по единому сценарию, что проявлялось в значительном увеличении количества трансформированных форм в первые трое суток после иммунизации. Универсальность молекулярных механизмов повреждения клеток обуславливает определенный стереотип выявляемых изменений эритроцитов при иммунизации вакцинными штаммами чумного и туляремиального микроба. Сравнивая гистограммы кривой сечения эритроцитов в различные сроки наблюдения, следует отметить более глубокую складчатость мембранной поверхности эритроцитов на ранних сроках иммуногенеза с последующим сглаживанием контуров клеток, что укладывается в картину частичного восстановления нарушенной структуры мембраны и метаболизма эритроцитов, обусловленного пластическими возможностями системы гемопоэза.

Таким образом, в норме система гемопоэза реагирует на внешнее воздействие активным и быстрым восстановлением равновесия внутри себя, что позволяет рассматривать возможность

учета состояния ПАМЭ для характеристики адаптационно-компенсаторных реакций макроорганизма при вакцинном процессе.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Рязанцева Н.В. Типовые нарушения молекулярной организации мембраны эритроцитов при соматической и психической патологии / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // *Успехи физиологических наук*. - 2004. - Т. 35. - № 1. - С. 53-65.
2. Новицкий В.В. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, Т.С. Федорова, Е.Б. Кравец, В.В. Иванов, Т.В. Жаворонок, Н.Ю. Часовских, О.М. Чудиков, В.Н. Бутусова, Н.М. Яковлева // *Бюллетень Сибирской медицины*. - 2006. - Т. 5. - № 2. - С. 62-69.
3. Кузьмина О.А. Генетические маркеры и морфология эритроцитов в клинике хронического обструктивного бронхита / О.А. Кузьмина, Ю.И. Афанасьев, М.И. Чурносков // *Клиническая меди-*

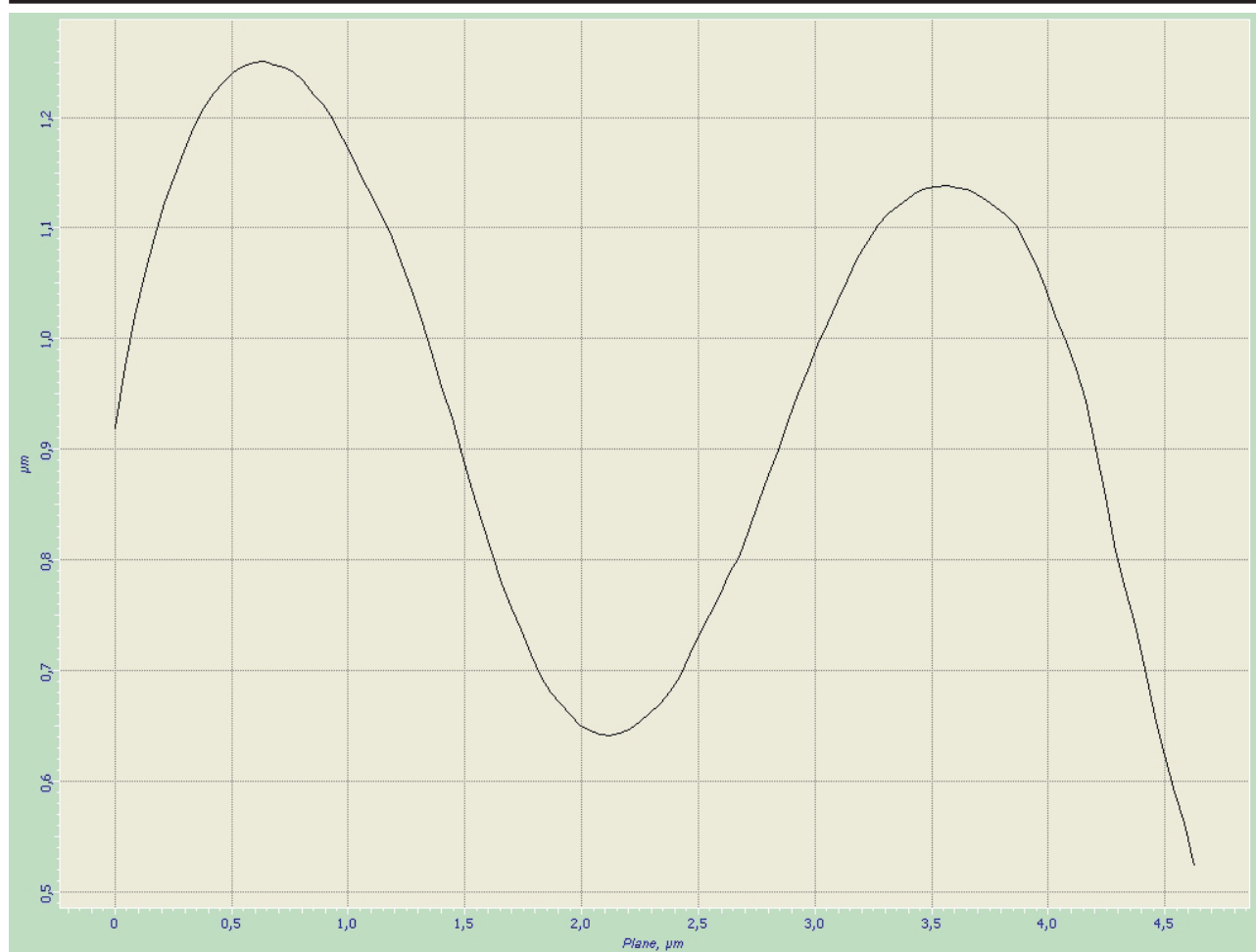


Рис. 3. Анализ рельефа эритроцитов в эксперименте. Вертикальный профиль клетки.

цина. - 2006. - №1. - С.24-27.

4. Buys A.V. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study / A.V. Buys, M.-J. Rooy, P. Soma, D.V. Papendorp, B. Lipinski, E. Pretorius // *Cardiovascular Diabetology*. - 2013. - № 12. - P. 25.

5. Теория и практика микроскопии эритроцита / под редакцией академика РАМН В.В. Новицкого, профессора Н.В. Рязанцевой. - Томск: Из-во «Печатная монофактура». - 2007. - 130 с.

6. Горшкова Е. Атомно-силовая микроскопия клеток крови человека / Е. Горшкова, С. Плескова, Э. Михеева // *Наноиндустрия*. - 2012. - Т. 43. - № 4. - С. 50-53.

7. Girasole M. Structure and function in native and pathological erythrocytes: a quantitative view from the nanoscale / M. Girasole, S. Dinarelli, G. Boumis // *Micron*. - 2012. - V. 43. - № 12. - P. 1273-1286.

8. Манчук В.Т. Структурно-функциональные параметры клеток крови в норме и при патологии у детей в условиях севера / В.Т. Манчук, В.П. Терещенко, С.Ю. Терещенко, А.А. Савченко // *Бюлле-*

тень СО РАМН. - 2003. - Т. 108. - № 2. - С. 12-16.

9. Гогуадзе Р.П. Изменение поверхности эритроцитарной мембраны крыс при хроническом темновом стрессе / Р.П. Гогуадзе, М.В. Чачуа, Н.Д. Кебурия, М.Д. Чипашвили, Г.Я. Алесидзе, Н.Г. Алесидзе // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2006. - Т. 141. - № 5. - С. 519-521.

10. Тарских М.М. Повреждение мембран эритроцитов в механизме токсического действия акрилатов / М. М. Тарских // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2006. - Т. 142. - N 12. - С. 646-648.

11. Рогов О.А. Поверхностная архитектура и липидный состав мембраны эритроцитов при отравлении монооксидом углерода в эксперименте / О.А. Рогов, И.А. Шперлинг, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // *Современные проблемы науки и образования*. - 2006. - № 6. - С. 92-93.

Авторская справка:

Бугоркова Светлана Александровна – зав. лабораторией патоморфологии отдела иммуноло-

гии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», доктор медицинских наук, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, (8452)515212, E-mail: rusrapi@micrube.ru

Клюева Светлана Николаевна – научный сотрудник лаборатории вакцинологии и иммуно-

профилактики отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», кандидат биологических наук, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, (8452)515212, E-mail: rusrapi@micrube.ru