

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ФОНЕ ТЕПЛОВОГО СТРЕССА

Н.Г. Плехова¹, Л.М. Сомова², Е.И. Дробот², А.В. Лагулева¹, И.Н. Ляпун²,
Н.М. Кондрашова¹, С.Д. Огнева¹

¹ ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Владивосток, Россия

² ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия

Резюме. Поддержание термостатического гомеостаза обеспечивается интегративным взаимодействием различных систем организма, в том числе иммунной, при координирующем влиянии гипоталамуса. Температурный стресс при инфекционных заболеваниях активизирует реакцию теплового шока, биохимическим последствием которого является инициация защиты организма от возбудителя. Клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы и макрофаги) являются первой линией защиты от патогенных агентов и играют первостепенную роль в развитии бактериальных инфекций. Определенный интерес представляет изучение длительности воздействия гипертермии для достижения баланса между биоэнергетическими затратами указанных клеток, а также исследование течения патологического процесса в организме, предварительно подвергнутого воздействию температуры. На модели животных, подвергнутых воздействию низкой (+4°C) и высокой (+30°C) температуры, изучено функциональное состояние нейтрофилов и макрофагов, включая фагоцитоз, активность ферментов кислородзависимой системы: лактатдегидрогеназы, цитохромоксидазы, миелопероксидазы, показателя стимуляции клеток (внутриклеточное содержание АМФазы) и содержание метаболитов оксида азота. Установлено, что в условиях гипертермии, изменение функциональной активности клеток по уровню ферментов более выражено, чем при воздействии на животных низкой температуры, особенно при 4-часовом воздействии. У животных, предварительно подвергнутых тепловому стрессу, проявления псевдотуберкулезной инфекции были более тяжелыми с увеличением показателей летальности в 2,6 раза, по сравнению с животными, инфицированными *Yersinia pseudotuberculosis*. У этих животных в начальные сроки (до 7 сут) наблюдалась высокая стимуляция эффекторных клеток воспаления, усиливался их метаболизм, который выражался в повышении активности ферментов кислород-зависимой системы, а также в высокой нитроксидпродуцирующей активности. На фоне выраженного геморрагического компонента патологического процесса и слабой клеточной воспалительной реакции в органах мишенях, наблюдалось истощение компонентов иммунной системы (делимфатизация), что указывало на снижение защитных реакций организма и развитие иммунодефицита. Таким образом в условиях теплового стресса (+30°C), напряженность реакции клеток врожденного иммунитета по показателям функциональной активности (АМФазы, ЛДГ, ЦХО, МПО) была выше, чем при воздействии на животных низкой температуры (+4°C). В указанных температурных условиях определялся высокий уровень праймированности клеток, что снижало их киллинговый потенциал. Эти данные указывают на адек-

Адрес для переписки:

Плехова Наталья Геннадьевна
690002, Россия, Владивосток, пр. Острякова, 4,
ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России.
Тел.: 8 (423) 242-97-78 (служебн.).
E-mail: pl_nat@hotmail.com

Contacts:

Natalia G. Plekhova
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakova pr., 4,
Pacific State Medical University.
Phone: +7 (423) 242-97-78 (office).
E-mail: pl_nat@hotmail.com

Библиографическое описание:

Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Лагулева А.В., Ляпун И.Н., Кондрашова Н.М., Огнева С.Д. Функциональная активность клеток врожденного иммунитета при бактериальной инфекции на фоне теплового стресса // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 43–53. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-43-53

Citation:

Plekhova N.G., Somova L.M., Drobot E.I., Lagureva A.V., Lyapun I.N., Kondrashova N.M., Ogneva S.D. The functional activity of innate immunity cells in bacterial infection on background of thermal stress // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 43–53. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-43-53

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (гос. контракт № 14-33-00009) и Федерального агентства научных организаций.

ватность используемой модели с целью воспроизведения индуцированного вторичного иммунодефицита по системе врожденной защиты. Причем, в патогенезе псевдотуберкулезной инфекции на фоне пролонгированного действия высокой температуры обнаруживались последствия окислительного стресса фагоцитов в структурных изменениях иммунокомпетентных органов.

Ключевые слова: гипертермия, тепловой стресс, нейтрофилы, макрофаги, ферменты, *Yersinia pseudotuberculosis*.

THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF INNATE IMMUNITY CELLS IN BACTERIAL INFECTION ON BACKGROUND OF THERMAL STRESS

Plekhova N.G.^a, Somova L.M.^b, Drobot E.I.^b, Lagureva A.V.^a, Lyapun I.N.^b, Kondrashova N.M.^a, Ogneva S.D.^a

^a Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Research Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Maintenance of thermo homeostasis under the coordinating influence of the hypothalamus is ensured by integrative interaction of various systems organism, including the immune system. Temperature stress in infectious diseases activates the reaction of heat shock, the biochemical consequence of which is the initiation of the organism's defense against the pathogen. Cells of innate immunity (neutrophils and macrophages) are the first line of protection against pathogenic agents and play a primary role in the development of bacterial infections. Of particular interest is the study of the duration of the effect of hyperthermia to achieve a balance between the bioenergetic costs of these cells, as well as the study of the course of the pathological process in an organism previously exposed to high temperature. The functional status of neutrophils and macrophages, including phagocytosis, the activity of enzymes of the oxygen-dependent system: lactate dehydrogenase, cytochrome oxidase, myeloperoxidase, cellular stimulation (intracellular AMPase content) and the content of nitrogen oxide metabolites have been studied in the model of animals exposed to low and high temperatures. It has been established that under hyperthermia conditions, the change in the functional activity of cells by enzyme level is more pronounced than when exposed to animals with low temperature, especially 4 h exposure. In animals pre-exposed to heat stress, manifestations of pseudotuberculosis infection were more severe with an increase in mortality rates by 2.6 times, compared to animals infected by bacteria. These animals had a high stimulation of effector cells of inflammation in the initial periods (at 7 days) their metabolism was enhanced, which was expressed of the activity of enzymes of the oxygen-dependent system, as well as in high nitroxide-producing activity. In target organs (lung, liver, spleen) of experienced animals the severe disturbance of blood circulation in combination with significant destructive changes typical for generalized infection were showed. At dead animals on the background of marked hemorrhagic component pathological process and weak cell inflammatory response observed depletion of the immune system (delimphatization), indicating a decrease in defense reactions and the development of immunodeficiency. Thus, under conditions of heat stress (+30°C), the intensity of the reaction of innate immunity cells in terms of enzyme's functional activity was higher than when exposed to animals of low temperature (+4°C). Under these temperature conditions, a high level of cell priming was determined, which reduced their killing potential. These data indicate the adequacy of the model used to reproduce induced secondary immunodeficiency in a congenital defense system. Moreover, in the pathogenesis of pseudotuberculosis infection against the background of prolonged action high temperature, the effects of phagocytes oxidative stress in the structural changes of immunocompetent organs were detected.

Key words: low and high temperature, heat stress, neutrophils, macrophages, enzymes, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Введение

Поддержание термостатического гомеостаза обеспечивается интегративным взаимодействием различных систем организма, в том числе иммунной, при координирующем влиянии гипоталамуса. При гипотермии снижается обмен веществ в клетках и тканях, уменьшается потребность организма в кислороде, что используется в медицинской практике для предупреждения временной ишемии мозга (гибернация). Применение гипертермии в качестве терапии (пиротерапия) при различных патологических состояниях организма обусловлено формированием высокочувствительных «контрольных точек», отвечающих за его терморегуляцию. Пиротерапия, искусственно вызванная лихо-

радка в диапазоне температур от 38,5 до 41,5°C, применяется как средство стимулирования противоопухолевой защиты организма [1, 6, 15]. Причиной применения пиротерапии послужили клинические наблюдения, свидетельствующие о более благоприятном течении и исходе некоторых инфекционных заболеваний на фоне высокой температуры [16], тогда как гипотермия негативно воздействует на защитные реакции организма [3]. Повышение температуры оказывает влияние на оксигенацию опухолевых клеток [22], инфильтрацию тканей опухоли специфическими цитотоксическими CD8⁺ Т-клетками [6, 7] и экспрессию клетками белков теплового шока [8]. Причем указывается, что температурный стресс при инфекционных заболеваниях активизирует реакцию теплового

шока, биохимическим последствием которого является инициация защиты организма от возбудителя [19].

Клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы и макрофаги) являются первой линией защиты от патогенных агентов, причем в последнее десятилетие существенно дополнено представление о их роли в развитии противoinфекционного ответа. Так, доказано опосредованное участие этих клеток в реализации защиты организма при экспрессии различных классов патоген-распознающих рецепторов (Toll-рецепторы, цитозольные рецепторы для ретиноевой кислоты [(RIG)-I-подобные] и нуклеотид-связывающих олигомеризированных доменовых [NOD-подобные]) [11, 12]. Степень экспрессии указанных рецепторов инициирует продукцию различных молекулярных компонентов как сигнальных внутриклеточных путей, так и межклеточного пространства [10, 22]. Также приводятся новые данные о разделении нейтрофилов и макрофагов на субпопуляции неактивированных и активированных клеток соответственно экспрессии рецепторов и функционального состояния [18]. С другой стороны, в проблеме резистентности организма к бактериальным инфекциям остается недостаточно изученным ряд вопросов, касающихся значимости ферментных систем клеток врожденного иммунитета и образования в них оксида азота. Активация цитозольных рецепторов и сопутствующие им конформационные изменения молекул, окружающие их, происходят при обязательном участии ферментов. На настоящий момент, механизмы влияния гипо- и гипертермии на клетки врожденного иммунитета остаются неясными, тогда как изменение температуры тела всего на 1°C влечет за собой метаболические затраты организма для поддержания его термостатического гомеостаза [5, 17]. Причем, определенный интерес представляет длительность воздействия гипертермии для достижения баланса между биоэнергетическими затратами клеток, связанными с терморегуляцией, а также течение патологического процесса в организме, предварительно подвергнутого воздействию температуры.

Цель исследования: в сравнительном аспекте изучить динамику показателей функциональной активности клеток врожденного иммунитета животных, подвергнутых воздействию высокой и низкой температур, и исследовать влияние общей гипертермии на патогенез инфекции, вызванной *Yersinia pseudotuberculosis*.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на беспородных белых мышцах весом 18–20 г, которые были разделены на 5 групп: 1 группа — интактные животные (5 шт.); 2 группа — животные, подвергнутые воздействию низкой (+4°C) температуры в течение 1, 2, 3 и 4 ч (40 шт.); 3 группа — животные,

подвергнутые воздействию высокой температуры (+30°C) в течение 4-х ч (20 шт.); 4 группа — животные, зараженные *Y. pseudotuberculosis* (30 шт.); 5 группа — животные, подвергнутые однократному тепловому стрессу 4 ч при +30°C и зараженные *Y. pseudotuberculosis* (30 шт.). У последних 3-х групп активность клеток исследовалась в динамике через 1, 2, 3, 7, 14 и 21 сут после заражения. Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996).

Создание гипертермических условий осуществляли методом нагревания животных в течение 2, 3 и 4 ч в воздушном термостате при температуре +30°C с принудительной вентиляцией (объем рабочей камеры 0,064 м³) при относительной влажности воздуха 60–68%, атмосферном давлении 744–760 мм рт.ст., содержании O₂ и CO₂ соответственно 20,5 и 0,10%. Измерение температуры нагреваемых животных производилось ректальным ртутным термометром с ценой деления 0,1°C, затем производили отбор клеток из перитонеального экссудата. Аналогично проводили воздействие на животных низкой температуры +4°C.

За 18 ч до проведения эксперимента с целью получения популяции нейтрофилов и макрофагов вызывали асептическое воспаление путем введения стерильной 1% пептонной воды по 0,2 мл в перитонеальную полость, затем получали первичную культуру фагоцитов. Концентрацию клеток доводили до 1×10^6 кл/мл в среде 199 (ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН) с 10% сывороткой крови плодов коровы (НПО «Вектор», п. Кольцово), инактивированной при +50°C, содержащую 2 мМ глутамин, 0,2 мМ гентамицина и 100 ед/мл пенициллина. Качество культуры оценивалось методом прижизненного наблюдения клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии. Для культивирования макрофагов использовали среду 199, которая содержала эмбриональную сыворотку коровы (5%), 0,2 мМ антибиотика гентамицина (100 мг/мл) и пенициллина (100 ед/мл). Помимо выявления стартового потенциала фагоцитов определяли их резервные возможности путем дополнительной инкубации клеток с *Y. pseudotuberculosis* в течение 30 мин.

Методы оценки функциональной активности фагоцитов

Фагоцитарную активность клеток определяли, используя в качестве тест-бактерий свежие культуры описанных выше штаммов микроорганизмов. После 30 и 120 мин контакта фагоцитов с объектами фагоцитоза, пробы фиксировались для определения завершенности фагоцитоза. Препараты окрашивались 0,1% раствором азур-

эозина в течение 15 мин. Определяли следующие показатели фагоцитоза: фагоцитарный показатель (ФП) — процент клеток, фагоцитировавших бактерии, и фагоцитарное число (ФЧ) — среднее количество бактерий, поглощенных одним фагоцитом.

Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ). К фиксированному монослою клеток добавляли 100 мкл субстрата для ЛДГ — йоднитротетразолий (ЙНТ, *iodonitrotetrazolium violet*, ICN) 2 мг/мл на основе фосфатного буфера pH = 7,2 с 0,4% $MnCl_2$. Монослой клеток с субстратами инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Гранулы диформаза растворяли добавлением 100 мкл изопропилового спирта, подкисленного 0,04 М HCl, в течение 20 мин. Оптическая плотность субстратов определялась на спектрофотометре при длине волны 540 нм. В качестве контроля использовались образцы с раствором подкисленного изопропилового спирта без клеток.

Определение активности цитохромоксидазы (ЦХО). проводили по методу Novikoff и Goldfischer в собственной модификации. К фиксированному монослою фагоцитов добавляли 100 мкл 0,1 М ацетатного буфера (pH = 5,5), содержащего 10 мг/мл $MnCl_2$ и 0,33% перекиси водорода, и 2 мг/мл диаминобензидина (3,3'-diaminobenzidine, ICN). После инкубирования в течение 10 мин при комнатной температуре реакцию останавливали добавлением 10% раствора серной кислоты по 100 мкл на лунку. Оптическая плотность полученных субстратов определялась на спектрофотометре при длине волны 492 нм. В качестве контроля использовались образцы с растворами субстратов и 10% серной кислоты.

Определение активности миелопероксидазы (МПО). В лунки планшетов, к фиксированным клеткам вносили по 100 мкл ОФД (*o*-phenylenediamine, ICN) (4 мг на 10 мл) на основе фосфатно-цитратного буфера (pH = 5,0) с добавлением 500 мкл 0,33% перекиси водорода. Монослой клеток инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем реакцию останавливали добавлением 10% раствора серной кислоты по 100 мкл на лунку. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре «Multiscan Titertek Plus» («Flow lab») при длине волны 492 нм. Бланкирование проводили по раствору ОФД и 10% серной кислоты.

Результаты спектрофотометрического исследования выражали в виде индекса стимуляции (Т), который вычисляли как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции клеток животных после воздействия температуры, и клеток от интактных животных, к среднему показателю оптической плотности раствора для клеток от интактных животных, в процентах.

Результаты

У животных после воздействия низкой (гипотермия) и высокой (гипертермия) температур определяли показатель стимуляции клеток (внутриклеточное содержание АМФазы — 5'-нуклеотидазы), активность ферментов кислородзависимой системы (ЛДГ, ЦХО, МПО), и в качестве показателя состояния нитроксидзависимой системы выявляли продукцию клетками метаболитов оксида азота NO. Исследовали указанные показатели функциональной активности фагоцитов при оценке бактерицидного потенциала после инкубации с *Y. pseudotuberculosis*. При изучении функционального состояния нейтрофилов и макрофагов животных, подвергнутых однократному воздействию высокой (+30°C) температуры, установлено, что наиболее физиологичным является временное воздействие до 4 ч. Более длительное воздействие проявляется в резком ухудшении общего состояния животных, так как для мышей оптимальный температурный диапазон содержания составляет от +14 до +18°C.

Фермент АМФаза локализуется в плазматической мембране клеток, и его активность регулирует уровень циклического АМФ, который обеспечивает передачу сигналов из внеклеточного пространства, и его содержание снижается в стимулированных клетках. Обнаружено достоверное снижение показателя активности АМФазы до $-8,3 \pm 0,6\%$ через 4 ч после воздействия высокой температуры, тогда как после воздействия низкой подобного изменения показателей не обнаружено (рис. 1А). Повышение показателей после контакта с *Y. pseudotuberculosis* указывало на реализацию бактерицидного потенциала фагоцитов.

В реакции преобразования субстратов при формировании супероксидного аниона кислорода O_2^* из молекулы кислорода принимают участие сукцинат- и лактатдегидрогеназы, которые активизируются на последнем этапе гликолиза. Значительное снижение индекса стимуляции для ЛДГ в клетках животных обнаруживались через 4 ч после воздействия высокой температуры, и достигло значения $-13,4 \pm 0,8\%$ (рис. 1Б). В фагоцитах животных, подвергнутых воздействию низкой температуры, напротив, показатели активности фермента повышались. ЦХО является терминальной оксидазой аэробной дыхательной цепи переноса электронов и ее активность коррелирует с метаболизмом клеток. Повышение активности ЦХО в фагоцитах, обнаруженное при воздействии высокой температуры на животных, указывало на стимуляцию метаболизма в этих клетках (рис. 1В). Также определенное значение при исследовании ферментативной активности фагоцитов имеет оценка состояния МПО, которая принимает участие в защитной реакции клетки от избыточного

количества реактивных посредников кислорода. Установлено достоверное снижение индекса стимуляции до $-4,1 \pm 0,5\%$ через 4 ч воздействия высокой температуры (рис. 1В). Образование оксида азота, наряду с продукцией активных метаболитов кислорода, обнаруживается в стимулированных бактериями и провоспалительными цитокинами фагоцитах. С помощью Гриесс-реакции определения метаболитов оксида азота — нитритов — нами была установлена несостоятельность нитриксиобразующей активности клеток под влиянием высокой температуры. Это выразилось в снижении внутриклеточного содержания нитритов по сравнению с показателями для интактных животных. Минимальный показатель наблюдался после 4 ч воздействия на животных и составил $-7,34 \pm 0,6\%$.

Таким образом, установлено, что в условиях гипертермии, изменение функционального состояния клеток по показателям активности ферментов АМФазы, ЛДГ, ЦХО и МПО было существеннее, чем при воздействии на животных низкой температуры ($+4^\circ\text{C}$). Во временном отношении наиболее выраженная функциональная

недостаточность по данным показателям фагоцитов выявлялась после 4 ч воздействия высокой температуры.

По показателям фагоцитоза установлено, что воздействие высокой температуры на экспериментальных животных ($+30^\circ\text{C}$) изменяет функциональное состояние клеток врожденного иммунитета (табл. 1). Представленные в таблице данные демонстрируют, что наибольшее значение индекса завершенности фагоцитоза (ИЗФ), которое отражает выживание и размножение бактерий в клетках, определялось в клетках животных, подвергнутых воздействию высокой температуры ($+30^\circ\text{C}$) в течение 4 ч. Данный показатель вычисляется как соотношение разницы между показателями фагоцитарного индекса (ФИ, количество поглощенных клетками бактерий) через 120 и 30 мин к показателю ФИ через 30 мин.

С целью уточнения состояния защитных функций клеток исследовались показатели активности ферментов клеток после воздействия температуры в динамике до 21 сут наблюдения. Обнаружено, что в фагоцитах в течение всего

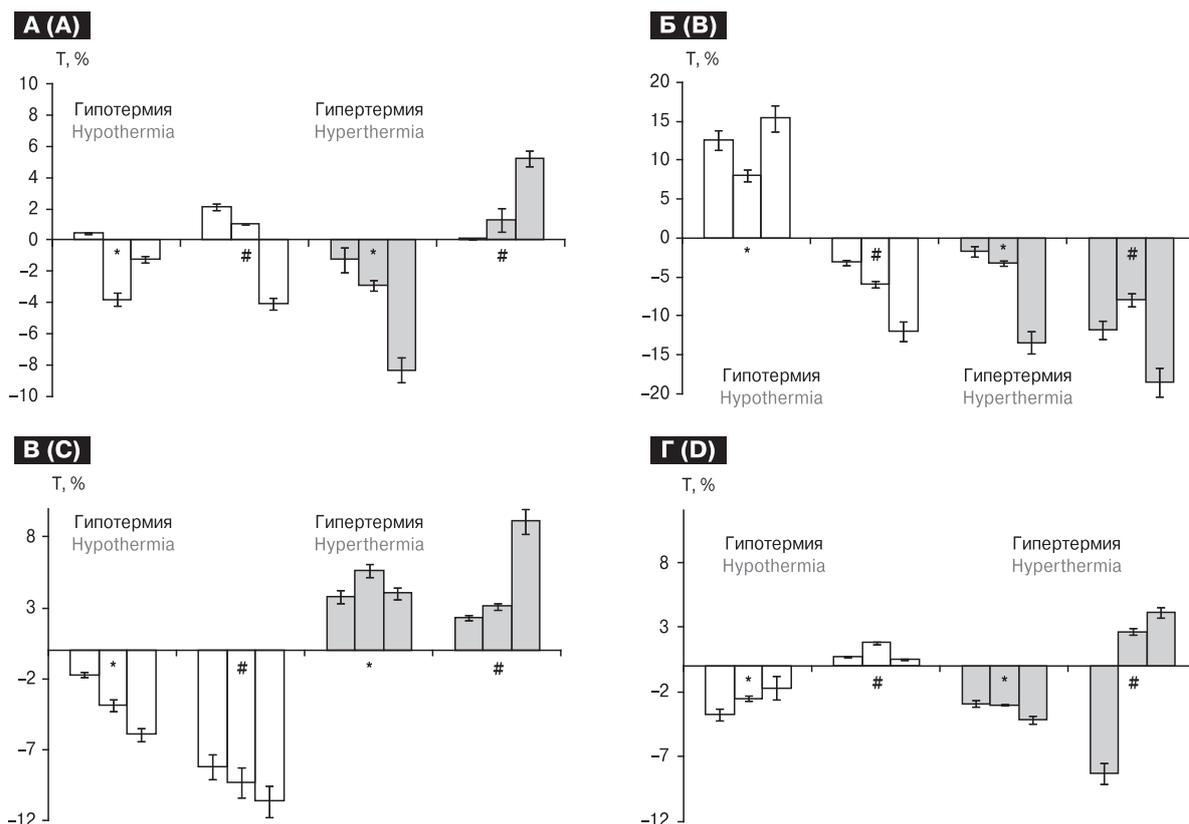


Рисунок 1. Активность ферментов АМФазы (А), лактатдегидрогеназы (Б), цитохромоксидазы (В) и миелопероксидазы (Г) нейтрофилов и макрофагов животных, после 2, 3 и 4 ч воздействия (1, 2, 3 столбики соответственно) низкой (гипотермия) и высокой (гипертермия) температуры

Figure 1. The activity of enzymes AMFase (A), lactate dehydrogenase (B), cytochrome oxidase (C) and myeloperoxidase (D) neutrophils and macrophages of animals, after 2, 3 and 4 hours of exposure (1st, 2nd, 3rd columns respectively) to low (hypothermia) and high (hyperthermia) temperatures

Примечание. * — нестимулированные фагоциты; # — после 30 мин контакта с *Y. pseudotuberculosis*.

Note.* — unstimulated phagocytes; # — after 30 min contact with *Y. pseudotuberculosis*.

Таблица 1. Фагоцитарные показатели клеток врожденного иммунитета

Table 1. Phagocytic indices of innate immunity cells

Показатели фагоцитоза Phagocytic indices		Группа 1 Group 1	Группа 3 (+30°C) Group 3 (+30°C)			Группа 4 (3 сут) Group 4 (3 days)	Группа 5 (3 сут) Group 5 (3 days)
			2 ч 2 hours	3 ч 3 hours	4 ч 4 hours		
Фагоцитарный индекс, ФИ Phagocytic index, PI	30 мин 30 min	7,8±0,5	7,1±0,8	6,5±0,4*	4,6±0,5**	6,1±0,5*	5,7±0,4**
	120 мин 120 min	9,2±0,8	8,9±0,7	10,2±1,5	12,4±1,3*	8,7±0,7	8,9±0,6
Фагоцитарный показатель, ФП (%) Phagocytic index, PI (%)	30 мин 30 min	87±7,5	87±7,2	75±6,5	58±5,1*	74±6,5	68±6,8
	120 мин 120 min	92±6,7	92±7,4	92±7,1	92±8,4	89±7,2	87±7,2
Индекс завершенности фагоцитоза, ИЗФ Index of phagocytosis completeness, IPF		0,2	0,3	0,6	1,7**	0,4	0,6

Примечание. *Сравнение со значениями для контроля при коэффициенте вероятности $p < 0,005$; **сравнение со значениями для контроля при коэффициенте вероятности $p < 0,001$.

Note. *Comparison with the values for the control with a probability coefficient $p < 0.005$; **comparison with the values for the control with a probability factor $p < 0.001$.

наблюдаемого периода отмечались сниженные показатели индекса стимуляции АМФазы, что указывало на стимулированное состояние клеток (рис. 2). По сравнению с контролем, наиболее выраженное снижение активности фермента наблюдалось через 3 сут после окончания воздействия высокой температуры на животных, индекс стимуляции составил $-15,03 \pm 1,7\%$. Также в этих клетках отмечалось снижение активности ЦХО и МПО, причем показатели для ЦХО не достигали контрольных на протяжении всего периода наблюдения при минимальном значении

через 3 сут. Индекс стимуляции в этот период составил $-13,2 \pm 1,2\%$, что указывало на нарушение защитной реакции клеток в ответ на температурный стресс (рис. 2). Причем в фагоцитах на протяжении всего наблюдаемого периода отмечалось повышенное содержание нитритов и ЛДГ.

Интерес представляют данные, полученные по изучению активности клеток животных после однократного воздействия высокой температуры и инфицированных вирулентным штаммом *Y. pseudotuberculosis*. У всех животных, под-

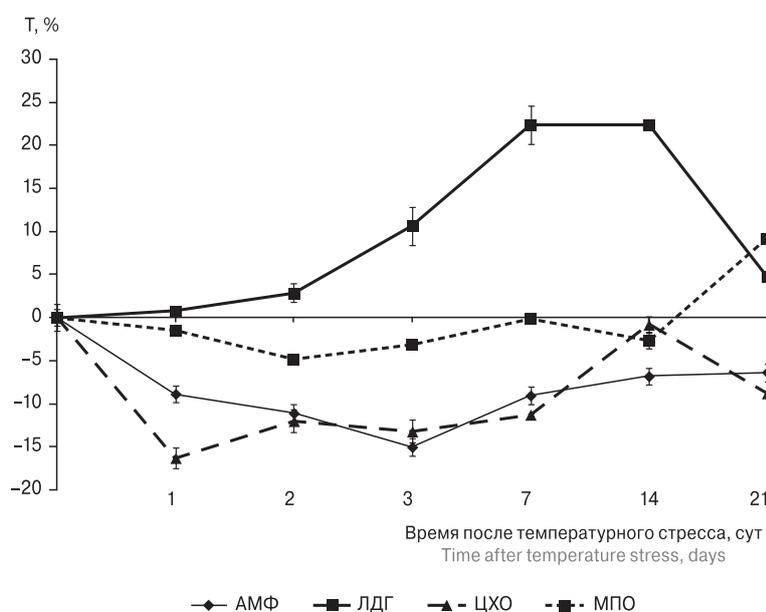


Рисунок 2. Активность ферментов АМФазы, лактатдегидрогеназы, цитохромоксидазы и миелопероксидазы в нейтрофилах животных, подвергнутых однократному воздействию высокой температуры

Figure 2. The activity of enzymes AMFase, lactate dehydrogenase, cytochrome oxidase and myeloperoxidase in neutrophils and macrophages of animals, after prolonged exposure to high temperature

вергнутых общей гипертермии, в течение первых суток отмечалась одышка, взмокающая шерсть. После заражения *Y. pseudotuberculosis*, начиная с 3-х сут у мышей 4-й и 5-й групп появлялись клинические признаки заболевания: вялость, отказ от пищи, часть животных последней группы погибла (23,6%). Проявления псевдотуберкулезной инфекции у животных, предварительно подвергнутых тепловому стрессу, были более тяжелыми с увеличением показателей летальности в 2,6 раза, по сравнению с животными контрольной группы без теплового стресса. Так, если полумлетальная доза LD_{50} для интактных животных составила $1,1 \times 10^8$ бактерий, то для групп животных подвергнутых однократному воздействию высокой температуры составило $5,41 \times 10^7$ и трехкратному $8,57 \times 10^7$. Эти данные указывают, что количество бактерий, вызывающих гибель 50% животных, уменьшалось в отношении мышей, подвергнутых тепловому стрессу.

В целом после предварительного теплового стресса у инфицированных животных в начальные сроки (до 7 сут) наблюдалась высокая стимуляция эффекторных клеток воспаления, усиливался их метаболизм, который выражался в повышении активности ферментов кислород-зависимой системы, а также в высокой нитроксидпродуцирующей активности (рис. 3). Активность ЛДГ и МПО в клетках животных зараженных после теплового стресса достигала максимального значения в первые трое суток после заражения и составила $14,9 \pm 1,4$ и $7,5 \pm 0,8\%$ соответственно, тогда как в фагоцитах животных, только зараженных бактериями, значения для этих ферментов составили $2,8 \pm 0,3$ и $-5,2 \pm 0,4\%$. В клетках этих животных не проявлялась активность ЦХО, тогда как количество метаболитов NO, выделяемых клетками, было высоким. Так, индекс стимуляции нарастал к 3 сут после заражения, достигая максимального значения

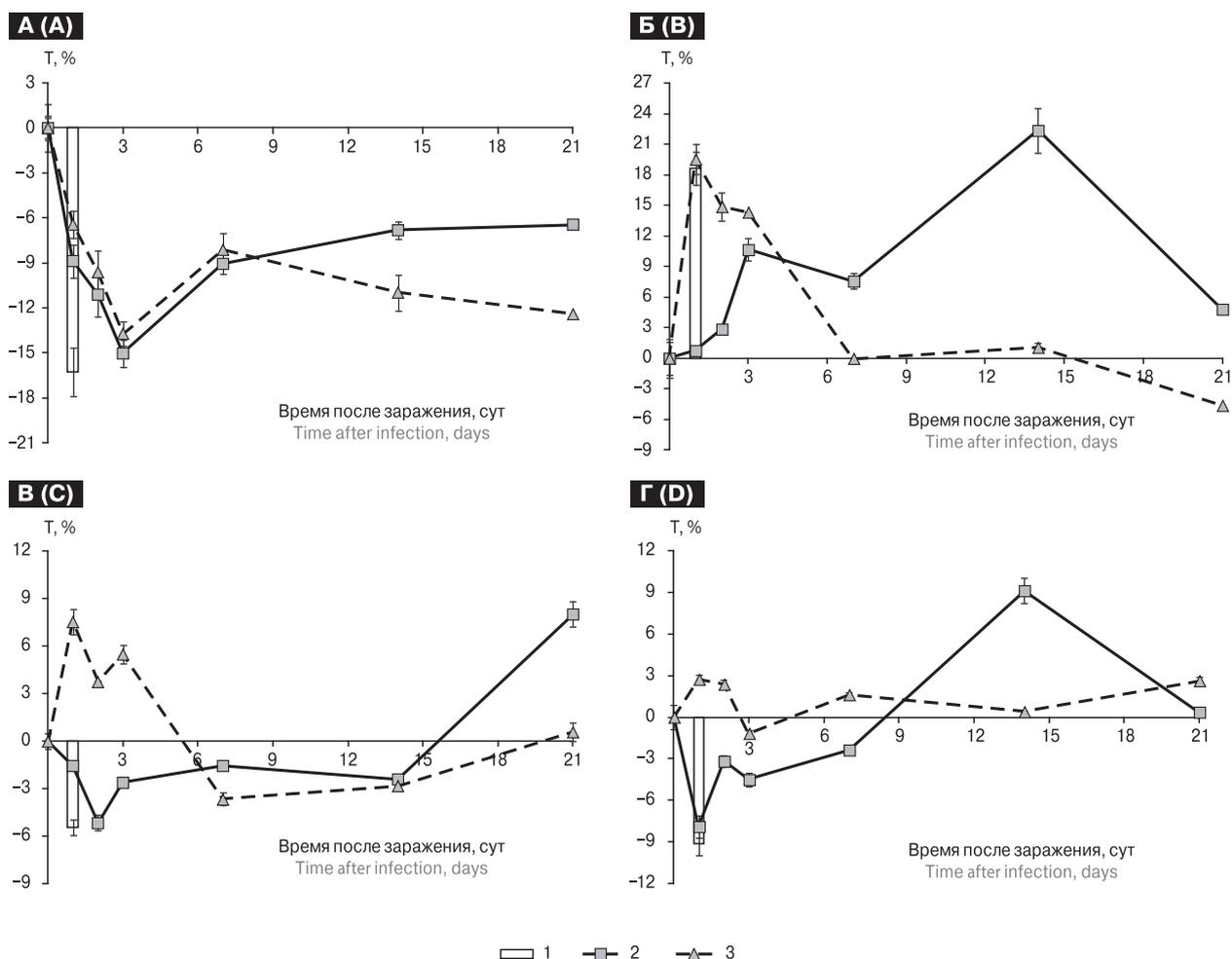


Рисунок 3. Активность ферментов АМФазы (А), лактатдегидрогеназы (Б), миелопероксидазы (В) и цитохромоксидазы (Г) в нейтрофилах и макрофагах интактных животных (1), зараженных *Y. pseudotuberculosis* (2) и предварительно, до инфицирования, подвергнутых однократному воздействию высокой температуры (3)

Figure 3. The activity of AMPase (A), lactate dehydrogenase (B), myeloperoxidase (C) enzymes and cytochrome oxidase (D) in neutrophils and macrophages of intact animals (1), infected with *Y. pseudotuberculosis* (2), and before infection, subjected to a single exposure to high temperature (3)

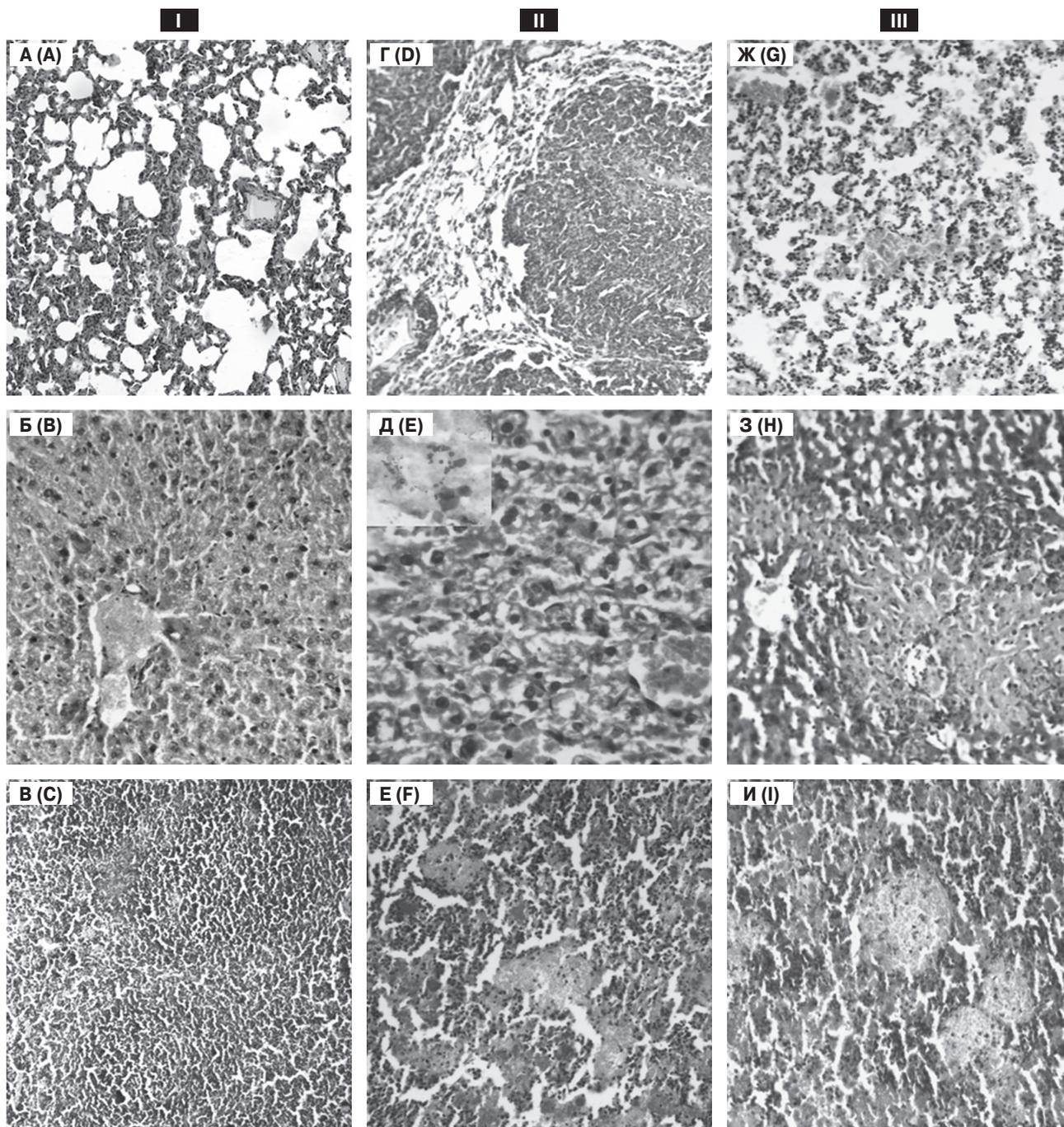


Рисунок 4. Органы животных после гипертермии

Figure 4. Organs of animals after hyperthermia

(I): A) умеренно выраженная сосудистая реакция в легком, $\times 100$; Б) многочисленные пикноморфные гепатоциты, $\times 200$; В) фолликулярная гиперплазия селезенки $\times 100$. Органы мышей, зараженных *Y. pseudotuberculosis* (II): Г) картина гранулематозного воспаления в легком; Д) выраженная зернистая дистрофия печени с апоптозными клетками, глыбки хроматина (фрагмент); Е) делимфатизация селезенки $\times 200$. Органы животных, зараженных *Y. pseudotuberculosis* после предварительной гипертермии (III): Ж) диффузное воспаление с выраженным геморрагическим компонентом в легком; З) воспалительный очажок в печени с распадом гепатоцитов; И) оголение ретикулярной стромы селезенки, $\times 200$. Окраска гематоксилином и эозином.

(I): A) a mild vascular reaction in the lung, $\times 100$; B) numerous pycnomorphogenic hepatocytes, $\times 200$; C) follicular hyperplasia of the spleen $\times 100$. The organs of mice infected with *Y. pseudotuberculosis* (II): D) granulomatous inflammation in the lung; E) severe granular dystrophy of the liver with apoptotic cells, fragments of chromatin (fragment); F) delimitation of the spleen $\times 200$. The organs of animals infected with *Y. pseudotuberculosis* after preliminary hyperthermia (III): G) diffuse inflammation with a pronounced hemorrhagic component in the lung; H) inflammatory foci in the liver with the disintegration of hepatocytes; I) denudation of the reticular stroma spleen, $\times 200$. Staining of hematoxylin and eosin.

(49,5±3,6%), после чего снижался к концу срока наблюдения (19,7±1,7%). В указанные сроки показатель для фагоцитов животных без предварительного воздействия высокой температурой и зараженных *Y. pseudotuberculosis* составил 15,1±1,4 и 8,7±0,9% соответственно.

В легких животных, исследованных в катаболическую фазу после воздействия гипертермии (первые часы после нее), отмечалась умеренно выраженная сосудистая реакция, в просвете части альвеол содержались эритроциты (рис. 4А). В печени отмечалось умеренное полнокровие сосудов, отчетливые дистрофические изменения, пикноз гепатоцитов обнаруживался преимущественно в периферическом отделе печеночных долек и в области портальных трактов (рис. 4Б). В селезенке выявлялась незначительная фолликулярная гиперплазия со слиянием фолликул белой пульпы (рис. 4В).

У животных, инфицированных *Y. pseudotuberculosis*, без предварительной гипертермии, в легких наблюдались гранулемы преимущественно из мононуклеарных клеток, которые с увеличением времени после заражения преобразовывались в обширные очаги воспаления и, у отдельных животных, отмечался значительный распад клеток очагов гранулематозного воспаления (рис. 4Г). Через 21 сут после заражения, у внешне активных животных, сохранялись типичные гранулемы, отграниченные соединительнотканной капсулой, характерные для псевдотуберкулезной инфекции, вызываемой вирулентным штаммом с плазмидами 45:82 MDa. В печени через 7 сут после заражения животных наблюдались многочисленные гранулемы небольших размеров без четкого отграничения от окружающей паренхимы, а также крупные участки эозинофильной дистрофии гепатоцитов с диффузной пролиферацией клеток Купфера (рис. 4Д). В селезенке наличие инфекции отмечалось появлением признаков делимфатизации пульпы селезенки с гигантоклеточной реакцией в красной пульпе (рис. 4Е).

В легких животных, предварительно, до заражения *Y. pseudotuberculosis* подвергнутых воздействию высокой температуры, наблюдались дилатация и резкое полнокровие сосудов типа венул, участки дистелектаза с повреждением стенки многих альвеол и бронхиол. Стенка многих венул была разрушена, в их просвете содержалась эозинофильная масса из лизированных клеток. Определялись крупные очаги воспаления, типичные для псевдотуберкулезной инфекции, с обилием мелкозернистого детрита в центре без четкого отграничения от окружающей ткани (рис. 4Ж). У отдельных животных наблюдались очажки гранулематозного воспаления, в которых визуализировались апоптотные клетки. В печени животных на фоне изменений, вызванных тепловым стрессом, обнаружены гранулематозное воспаление при наличии много-

численных рыхлых очажков, состоящих из мононуклеарных клеток с примесью клеточного детрита, незначительная пролиферация клеток Купфера (рис. 4З). В селезенке определялись деструктивные изменения клеток и отчетливая делимфатизация части фолликулов белой пульпы, встречались единичные крупные гранулемы с центральным некрозом и разреженной окружающей зоной (рис. 4И).

В целом, данные гистологического исследования органов-мишеней животных, предварительно до заражения *Y. pseudotuberculosis*, подвергнутых однократному воздействию высокой температуры, указывают на более резкое нарушение гемоциркуляции в сочетании со значительными деструктивными изменениями по сравнению с результатами исследования органов животных с инфекцией. Причем у погибших животных на фоне выраженного геморрагического компонента патологического процесса и слабой клеточной воспалительной реакции наблюдалось истощение органов иммунной системы (делимфатизация), что указывало на снижение защитных реакций организма и развитие иммунодефицита.

Обсуждение

Итак, нами установлено, что в условиях теплового стресса (+30°C), напряженность реакции клеток врожденного иммунитета по показателям функциональной активности (АМФазы, ЛДГ, ЦХО, МПО) была выше, чем при воздействии на животных низкой температуры (+4°C). В указанных температурных условиях высокий уровень праймированности клеток снижал киллинговый потенциал, о чем свидетельствовали фагоцитарные показатели. Таким образом, после проведения общей гипертермии у животных отмечается снижение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов, что может быть объяснено с позиций развития «стресс-синдрома» в ответ на воздействие высокой температуры. Изменения метаболизма клеток, по видимому, оказывает влияние на синтез молекул адгезии и других факторов, таких как цитокины, которые в дальнейшем оказывают влияние на развитие иммунного ответа [21].

Реакция теплового шока — древний и консервативный процесс, который необходим для выживания организма в изменяемом экологическом окружении, в том числе при возникновении экстремальных температур. Так, лихорадка является поздним ответом на инфекцию, при котором организм временно подвергается температурному стрессу. Биохимические последствия лихорадки и теплового шока могут быть направлены на уничтожение или ингибирование роста патогенов, чувствительных к повышению температуры, индуцировать деятельность цитопротекторных белков теплового шока (Hsps) в клет-

ках-хозяевах или запускать экспрессию в самих возбудителях этих белков Hsps, тем самым активируя защиту организма с модификацией его реактивности [4]. Повышение температуры тела на 2–3°C во время лихорадки активирует механизм отклика теплового шока при модификации экспрессии генов цитокинов и хемокинов, изменяя клеточную сигнализацию и мобилизацию иммунных клеток к участкам воспаления, инфекции и травмы [19]. В литературе активно дискутируется вопрос о механизмах действия локальной и общей гипертермии на организм человека и ее влиянии на патогенез различных заболеваний. Предполагается, что на фоне теплового стресса происходит динамическое изменение системы иммунитета, когда на определенных сроках после общей гипертермии и/или при ее длительном воздействии отмечается активация или угнетение функции иммунокомпетентных клеток [2, 13], и также, очень ограничено, встречаются публикации, отражающие влияние общей гипертермии на патоморфогенез инфекционных заболеваний.

С другой стороны, лихорадка при бактериальной инфекции не всегда может выступать в роли защиты, и ее проявление зависит от вида патогенного микроорганизма [20]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что у животных, предварительно подвергнутых тепловому стрессу, проявления экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции более тяжелые с увеличением показателей летальности в 2,6 раза, по сравнению с животными, просто зараженными *Y. pseudotuberculosis*. Таким образом, концепция термического ограничения инфекции очевидна, но не всегда выполнима, так как при воздействии высокой температу-

ры на иммунную систему организма осуществляемый контроль над развитием инфекции не всегда положителен. Например, секреция пирогенных цитокинов в ответ на инфекцию индуцирует возникновение локальных иммунных реакций и связанный с ними окислительный взрыв в нейтрофилах, что в последующем отмечается миграцией иммунных клеток в инфицированные ткани и наличием некроза окружающих тканей [5, 9]. С другой стороны, полученные нами данные на экспериментальной модели бактериальной инфекции при предварительном воздействии высокой температуры (+30°C) указывают на адекватность используемой модели с целью воспроизведения индуцированного вторичного иммунодефицита для изучения влияния клеток врожденного иммунитета на развитие инфекции. Во временном отношении наиболее выраженная функциональная недостаточность указанных клеток выявлялась после 4 ч воздействия, существенно снижая показатели активности фагоцитов. Причем в случае пролонгированного воздействия высокой температуры обнаруживаются последствия окислительного стресса фагоцитов, который приводит к снижению ресурса защиты клеток. В этих условиях способность макрофагов и нейтрофилов в активном состоянии продуцировать оксид азота, который оказывает влияние на синтез IFN γ и TNF α [14], позволяет данным клеткам быть эффекторами каскада иммунных реакций и в последующем воздействовать на адаптивную реакцию организма при гипертермии. В целом, недостаточная реактивность клеток врожденного иммунитета оказывает влияние на патогенез бактериальной инфекции, утяжеляя ее течение.

Список литературы/References

1. Баллюзек Ф.В., Баллюзек М.Ф., Виленский В.И., Горелов С.И., Жигалов С.А., Иванов А.А., Кузьмин С.Н., Определяков Г.А. Управляемая гипертермия. СПб.: Невский диалект, 2001. 110 с. [Ballyuzek F.V., Ballyuzek M.F., Vilenskii V.I., Gorelov S.I., Zhigalov S.A., Ivanov A.A., Kuz'min S.N., Opredelyakov G.A. Upravlyayemaya gipertermiya [Controlled hyperthermia]. Saint Petersburg: Nevsky dialect, 2001. 110 p.]
2. Мичурина С.В., Васендин Д.В., Ищенко И.Ю., Жданов А.П. Структурные изменения в тимусе крыс после воздействия экспериментальной гипертермии // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. 2010. № 1 (25). С. 30–33. [Michurina S.V., Vasendin D.V., Ischenko I.Yu., Zhdanov A.P. Structural changes in the thymus of rats after exposure to experimental hyperthermia. *Bulleten' Volgogradskogo nauchnogo tsentra RAMN = Bulletin of the Volgograd Scientific Center of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2010, no. 1 (25), pp. 30–33. (In Russ.)]
3. Arons M.M., Wheeler A.P., Bernard G.R., Christman B.W., Russell J.A., Schein R., Summer W.R., Steinberg K.P., Fulkerson W., Wright P., Dupont W.D., Swindell B.B. Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. Ibuprofen in Sepsis Study Group. *Crit. Care Med.*, 1999, vol. 27, iss. 4, pp. 699–707. doi: 10.1097/00003246-199904000-00020
4. Casadevall A. Thermal restriction as an antimicrobial function of fever. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 5:e1005577. doi: 10.1371/journal.ppat.1005577
5. Evans S.S., Repasky E.A., Fisher D.T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, vol. 15, no. 6, pp. 335–349. doi: 10.1038/nri3843
6. Frey B., Weiss E.M., Rubner Y., Wunderlich R., Ott O.J., Sauer R., Fietkau R., Gaipf U.S. Old and new facts about hyperthermia-induced modulations of the immune system. *Int. J. Hyperthermia*, 2012, vol. 28, iss. 6, pp. 528–542. doi: 10.3109/02656736.2012.677933
7. Fisher D.T., Chen Q., Skitzki J.J., Muhitch J.B., Zhou L., Appenheimer M.M., Vardam T.D., Weis E.L., Passanese J., Wang W.C., Gollnick S.O., Dewhirst M.W., Rose-John S., Repasky E.A., Baumann H., Evans S.S. IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells. *J. Clin. Invest.*, 2011, vol. 121, no. 10, pp. 3846–3859. doi: 10.1172/JCI44952

8. Grunwald M.S., Pires A.S., Zanotto-Filho A., Gasparotto J., Gelain D.P., Demartini D.R., Schöler C.M., de Bittencourt P.I.Jr., Moreira J.C. The oxidation of HSP70 is associated with functional impairment and lack of stimulatory capacity. *Cell Stress Chaperones*, 2014, vol. 19, iss. 6, pp. 913–925. doi: 10.1007/s12192-014-0516-5
9. Hasday J.D., Thompson C., Singh I.S. Fever, immunity, and molecular adaptations. *Compr. Physiol.*, 2014, vol. 4, pp. 109–148. doi: 10.1002/cphy.c130019
10. Hevia A., Delgado S., Sánchez B., Margolles A. Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6:1285. doi: 10.3389/fmicb.2015.01285
11. Hume D.A. The many alternative faces of macrophage activation. *Front. Immunol.*, 2015, vol. 6:370. doi: 10.3389/fimmu.2015.00370
12. Jaillon S., Galdiero M.R., Del Prete D., Cassatella M.A., Garlanda C., Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin. Immunopathol.*, 2013, vol. 35, iss. 4, pp. 377–394.
13. Jin Y., Hu Y., Han D., Wang M. J. Chronic heat stress weakened the innate immunity and increased the virulence of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 in mice. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, 10 p. doi: 10.1155/2011/367846
14. Martinez F.O., Helming L., Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, vol. 27, pp. 451–483. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132532
15. Mikucki M.E., Fisher D.T., Ku A.W., Appenheimer M.M., Muhitch J.B., Evans S.S. Preconditioning thermal therapy: flipping the switch on IL-6 for anti-tumour immunity. *Int. J. Hyperthermia*, 2013, vol. 29, no. 5, pp. 464–473. doi: 10.3109/02656736.2013.807440
16. Radek K.A. Antimicrobial anxiety: the impact of stress on antimicrobial immunity. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, vol. 88, no. 2, pp. 263–277. doi: 10.1189/jlb.1109740
17. Repasky E.A., Eng J., Hylander B.L., Radek K.A. Stress, metabolism and cancer: integrated pathways contributing to immune suppression. *Cancer J.*, 2015, vol. 21, no. 2, pp. 97–103. doi: 10.1097/ppo.000000000000107
18. Schmidt S., Moser M., Sperandio M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol. Immunol.*, 2013, vol. 55, no. 1, pp. 49–58. doi: 10.1016/j.molimm.2012.11.006
19. Singh I.S., Hasday J.D. Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int. J. Hyperthermia*, 2013, vol. 29, no. 5, pp. 423–435. doi: 10.3109/02656736.2013.808766
20. Small P.M., Tauber M.G., Hackbarth C.J., Sande M.A. Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect. Immun.*, 1986, vol. 52, no. 2, pp. 484–487.
21. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, vol. 140, no. 6, pp. 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022
22. Vujaskovic Z., Poulson J.M., Gaskin A.A., Thrall D.E., Page R.L., Charles H.C., MacFall J.R., Brizel D.M., Meyer R.E., Prescott D.M., Samulski T.V., Dewhirst M.W. Temperature-dependent changes in physiologic parameters of spontaneous canine soft tissue sarcomas after combined radiotherapy and hyperthermia treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2000, vol. 46, iss. 1, pp. 179–185. doi: 10.1016/S0360-3016(99)00362-4

Авторы:

Плехова Н.Г., д.б.н., зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет (ТГМУ) МЗ РФ, г. Владивосток, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Сомова Л.М., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Дробот Е.И., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Лагурева А.В., младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия;

Ляпун И.Н., к.б.н., зав. лабораторией клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Кондрашова Н.М., к.м.н., доцент Института терапии и инструментальной диагностики ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия;

Огнева С.Д., аспирант Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Plekova N.G., PhD, MD (Biology), Head of the Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Somova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Drobot E.I., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Lagureva A.V., Junior Researcher, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Lyapun I.N., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Kondrashova N.M., PhD (Medicine), Associate Professor, Institute of Therapy and Instrumental Diagnostics, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Ogneva S.D., PhD Student, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.07.2017
Отправлена на доработку 23.01.2018
Принята к печати 27.02.2017

Received 07.07.2017
Revision received 23.01.2018
Accepted 27.02.2017