

МОДЕЛИРОВАНИЕ *in vitro* ЗАЩИТНЫХ ИММУННЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

А.Д. СЕРЕДА

Свиньи, выжившие после инфицирования вирусом африканской чумы свиней (АЧС), устойчивы к повторному заражению гомологичными по сероиммунотиповой принадлежности вирулентными изолятами, что свидетельствует о формировании иммунологической защиты. Однако вопросы о протективной значимости различных механизмов иммунитета при африканской чуме свиней до сих пор остаются дискуссионными. В работе представлены результаты определения роли клеточного и гуморального звеньев иммунитета в ограничении репродукции вируса АЧС. В качестве моделей реализуемых вирус-специфических реакций *in vivo* использованы культуры лейкоцитов периферической крови, полученные от интактных и привитых свиней. Максимальное накопление вируса АЧС зарегистрировано в культуральных системах, в состав которых входили адгезированные клетки от интактного или иммунизированного подсвинка, а также неприкрепившиеся клетки белой крови и сыворотка от интактного животного. Замена неприкрепившихся клеток от интактного подсвинка на аналогичные от иммунизированного приводила к достоверному снижению накопления вируса АЧС. В присутствии А-клеток интактного или иммунизированного подсвинка, неприкрепившихся клеток от интактного и сыворотки от иммунизированного животного накопление вируса АЧС ограничивалось сильнее, а в том же варианте, но с неприкрепившимися клетками от иммунизированной особи, — в наибольшей степени. Установлено, что механизмы защиты, в реализации которых участвуют цитотоксические Т-лимфоциты и антителоопосредованные противоклеточные эффекторы, действуют интегрированно, что позволяет предположить их направленность против различных эпитопов.

Ключевые слова: африканская чума свиней, иммунитет, антитела, цитотоксические Т-лимфоциты.

Keywords: African swine fever, immune system, antibodies, cytotoxic T-lymphocytes.

Свиньи, пережившие инфицирование вирулентным или аттенуированным штаммами вируса африканской чумы свиней (АЧС), как правило, не погибают от повторного заражения гомологичными по сероиммунотиповой принадлежности вирулентными изолятами или штаммами (1-3). Это свидетельствует о формировании вирусспецифической иммунной защиты. Однако до сих пор остаются дискуссионными вопросы о протективной значимости гуморальных и клеточных звеньев иммунитета при АЧС.

Несмотря на отсутствие при АЧС противовирусных нейтрализующих антител, имеются экспериментальные данные об антителозависимом компоненте устойчивости к вирусной инфекции (4). Сообщалось, что перенос сыворотки или молозива от выживших после переболевания АЧС животных интактным свиньям может задержать проявление клинических симптомов, уменьшить виремия и увеличить процент выживших особей после их заражения вирусом АЧС (1, 5, 6). *In vitro* продемонстрирован антителоопосредованный цитолиз зараженных вирусом АЧС моноцитов и макрофагов в реакциях комплемент-зависимого цитолиза (КЗЦ) и антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (7-9). С использованием различных методов, в том числе АЗКЦ, в сыворотке крови свиней обнаружены антитела к вирус-специфическим белкам уже на 3-7-е сут после инокуляции вируса АЧС. У выживших животных они определяются длительное время (9, 10). Экспериментально доказано важное значение цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в формировании вирус-специфической защиты в ранние сроки после инфицирования вирусом АЧС (11, 12). Вместе с тем до их пор недостаточно изучен вклад АЗКЦ-, КЗЦ- и ЦТЛ-опосредованных механизмов в ограничение репродукции вируса АЧС, хотя исследования в этом направлении предпринимались (13).

Целью настоящей работы было определение значения клеточного и гуморального звеньев иммунитета в ограничении репродукции вируса африканской чумы свиней (АЧС) в модельных системах из культур лейкоцитов периферической крови интактного и иммунизированного аттенуированным штаммом вируса АЧС подсвинка на 6-е сут после прививки.

Методика. В работе использовали вирус АЧС из музея микроорганизмов Всероссийского НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии: вирулентные штаммы Ф-32 IV сероиммунотипа и К-73 II сероиммунотипа, а также их аттенуированные производные (соответственно штаммы ФК-135 и КК-202) (14).

Продукцию интерлейкина-2 (IL-2) лимфоцитами периферической крови исследуемых свиней в ответ на стимуляцию конканавалином А измеряли по активности пролиферации IL-2 зависимой линии клеток Т-лимфоцитов мыши (СТLL-2), которую оценивали по включению ³H-тимидина. Для этого у интактных и инокулированных вирусом АЧС подсвинков породы крупная белая массой 40-45 кг брали кровь из передней полой вены, смешивали с гепарином (20 ед/см³) и выделяли лимфоциты в градиенте плотности, используя фиколл-пак. Лимфоциты (3 млн/см³) культивировали в среде RPMI 1640 («Sigma-Aldrich», США) с добавлением фетальной телячьей сыворотки (10 %), глутамина (1 мМ), 2-меркаптоэтанол (2×10⁻⁵ М) (среда культивирования) и 5 мкг/см³ конканавалина А в течение 48 ч при 37 °С во влажной атмосфере (воздух + 5 % СО₂). По окончании суспензию клеток центрифугировали при 800 g 30 мин. Надосадок осветляли при 10 000 g 30 мин. Далее к 10⁴ клеток СТLL-2 в 0,1 см³ среды культивирования добавляли по 0,1 см³ полученных надосадков, в которых конканавалин А был блокирован добавлением 1 % (масса/объем) метил-α-D-маннопиранозида. Спустя 1 сут культивирования в смеси вносили ³H-тимидин (по 1850 МБк) и через 6 ч измеряли включение радиоактивно меченного предшественника в клетки. Определение проводили в 6 повторностях и обрабатывали результаты статистически.

Для моделирования *in vitro* защитных иммунных механизмов при АЧС венозную кровь отбирали из передней полой вены подсвинка на 0 сут и через 6 сут после его иммунизации штаммом ФК-135 (10^{7,5} ГАЕ₅₀). Половину объема взятой венозной крови смешивали с гепарином (20 ед/см³) и оставляли на 1,5 ч при 37 °С. Пипеткой отбирали белую кровь и осаждали при 800 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в 0,1 % гидролизате лактальбумина на солевом растворе Эрла с 5 % фетальной сыворотки теленка (среда культивирования), суспензию (5 млн кл/см³) разливали по 9 см³ в чашки Карреля и культивировали при 37 °С. Из второй половины объема взятой венозной крови подсвинка получали сыворотку по общепринятой методике.

На 8-е сут после начала эксперимента неприкрепившиеся клетки в среде культивирования в каждой из чашек Карреля с культурой лейкоцитов крови отдельно сливали в стерильные центрифужные пробирки, а А-клетки заливали средой культивирования (5 см³). Неприкрепившиеся клетки из каждой чашки осаждали при 800 g в течение 20 мин. Полученные осадки ресуспендировали в 9 см³ среды культивирования и переносили в чашки Карреля с А-клетками по разработанной для эксперимента схеме, предварительно удалив из них помещенную ранее среду культивирования. Затем в чашки Карреля вносили по 1,0 см³ (10 %) сыворотки подсвинка, полученной на 0- или 6-е сут после иммунизации, по разработанной схеме. Во все чашки Карреля добавляли штамм Ф-32 (по 100 ГАЕ₅₀ в объеме 0,5 см³) и инкубировали при 37 °С в течение 4 сут.

Накопление вируса АЧС определяли титрованием в культуре лейкоцитов свиней по гемадсорбции и выражали в ГАЕ₅₀/см³.

Для статистической обработки полученных данных использовали стандартную компьютерную программу BIOSIS-1.

Результаты. Культуры лейкоцитов периферической крови свиней допустимо рассматривать как модели *in vitro*, в которых реализуются вирус-специфические иммунологические реакции, происходящие в течение анализируемого периода *in vivo*. Методологической основой работы послужила возможность смоделировать культуры лейкоцитов крови свиней в различных вариациях из трех компонентов: адгезированных на стекле клеток-мишеней (А-клетки, макрофаги), клеток-эффекторов (лимфоциты) в составе неприкрепившихся к стеклу клеток и сыворотки крови. Важно, что все исследования проводились в аутологических системах при неизменной антигенпредставляющей способности А-клеток (9).

Для достижения поставленной цели важно было подобрать штаммы одной сероиммунотиповой группы, чтобы один из них был иммуногенным, другой — вирулентным. При этом иммуногенный штамм не должен обладать выраженными иммуносупрессивными свойствами. Поэтому на первом этапе работы оценивалось функциональное состояние лимфоцитов периферической крови в организме свиней, инокулированных различающимися по вирулентности и сероиммунотиповой принадлежности штаммами вируса АЧС. Для этого исследовали способность Т-лимфоцитов крови секретировать ИЛ-2, который совместно с вирус-специфическими антигенами вызывает активацию и клональную экспансию антигенспецифических покоящихся цитотоксических Т-лимфоцитов.

1. Продукция ИЛ-2 стимулированными конканавалином А лимфоцитами периферической крови от интактных, иммунизированных штаммами ФК-135 и КК-202, а также зараженных штаммами Ф-32 и К-73 подсвинков породы крупная белая

Состояние подсвинков	Разведение супернатантов	Продукция ИЛ-2, имп/мин			
		1-й	2-й	3-й	4-й
Номер подсвинка					
Интактные	1:2	4127±217	3944±108	4321±95	4111±73
	1:4	2345±301	2227±94	2531±119	2004±54
	1:8	1672±74	1471±104	1750±96	1421±139
Иммунизированные, штамм ФК-135	1:2	4435±282	3884±171	—	—
	1:4	2212±86	2035±74	—	—
	1:8	1325±77	1118±49	—	—
Зараженные, штамм Ф-32	1:2	3874±118	3439±109	1917±91	1812±145
	1:4	2031±43	1931±72	235±120	1098±81
	1:8	1675±92	920±67	629±66	531±42
Номер подсвинка		5-й	6-й	7-й	8-й
Интактные	1:2	3452±194	3160±97	2930±162	3001±108
	1:4	1878±104	1662±64	1645±79	2012±98
	1:8	1103±59	863±57	865±41	977±73
Иммунизированные, штамм КК-202	1:2	2308±98	1876±209	—	—
	1:4	1146±38	864±46	—	—
	1:8	712±27	409±29	—	—
Зараженные, штамм К-73	1:2	1966±157	2142±174	1322±96	1541±62
	1:4	886±84	975±33	598±34	843±51
	1:8	448±16	462±28	280±16	377±39

Примечание. Прочерки означают, что измерения не производили.

Двух подсвинков иммунизировали штаммом ФК-135 ($10^{7,5}$ ГАЕ₅₀), двух других — штаммом КК-202 ($10^{7,5}$ ГАЕ₅₀). Через 2 нед обоим подсвинкам, иммунизированным штаммом ФК-135, и двух интактных заражали штаммом Ф-32 ($10^{3,0}$ ГАЕ₅₀), а иммунизированных штаммом КК-202 и еще двух интактных — штаммом К-73 ($10^{3,0}$ ГАЕ₅₀). На 6-е сут после каждой инокуляции определяли продукцию ИЛ-2 стимулированными конканавалином А лимфоцитами периферической крови.

Полученные результаты (табл. 1) свидетельствуют, что иммунизация подсвинков штаммом ФК-135 и их последующее заражение штаммом Ф-32 не снижали функциональной активности Т-лимфоцитов. Заражение интактных подсвинков вирулентным штаммом Ф-32 приводило к супрессии Т-лимфоцитов, что проявлялось в уменьшении продукции ИЛ-2 более чем в 2 раза. Инокуляция свиньям как аттенуированного штамма КК-202, так и вирулентного штамма К-73 вызывала достоверное снижение продукции ИЛ-2 в 1,5-2,0 раза. В эксперимент по моделированию иммунных защитных механизмов *in vitro* были взяты штаммы IV сероиммунотипической группы Ф-32 и ФК-135, поскольку последний не вызывает иммуносупрессии лимфоцитов свиней.

Эксперимент по моделированию защитных иммунных механизмов при АЧС *in vitro* на 6-е сут после иммунизации показал (табл. 2), что максимальное накопление вируса АЧС ($7,50-7,67 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$) зарегистрировано в культуральных системах № 1 и № 5, в состав которых входили адгезированные клетки от интактного или иммунизированного подсвинка, а также неприкрепившиеся клетки белой крови и сыворотка от интактного животного.

2. Накопление вируса африканской чумы свиней (штамм Ф-32) в аутологических культурах лейкоцитов периферической крови интактного (ИН) и иммунизированного (ИМ) штаммом ФК-135 подсвинка породы крупная белая, смоделированных в соответствии с разработанной для эксперимента схемой

№ системы	А-клетки		Сыворотка		Лимфоциты		Титр вируса, $\lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$
	ИН	ИМ	ИН	ИМ	ИН	ИМ	
1	+	-	+	-	+	-	$7,67 \pm 0,33$
2	+	-	+	-	-	+	$7,00 \pm 0,21$
3	+	-	-	+	+	-	$6,33 \pm 0,43$
4	+	-	-	+	-	+	$5,67 \pm 0,21$
5	-	+	+	-	+	-	$7,50 \pm 0,07$
6	-	+	+	-	-	+	$6,67 \pm 0,26$
7	-	+	-	+	+	-	$5,67 \pm 0,43$
8	-	+	-	+	-	+	$5,00 \pm 0,21$

Примечание. «+» и «-» — соответственно наличие и отсутствие компонента.

Замена в системе культивирования неприкрепившихся клеток от интактного подсвинка на неприкрепившиеся клетки от иммунизированного (№ 2 и № 6) приводила к достоверному снижению накопления вируса АЧС на $0,67-0,83 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$. Основным ограничивающим механизмом в указанной конфигурации могли быть ЦТЛ, поскольку сыворотку брали от интактного подсвинка и вирус-специфические антителозависимые механизмы защиты не действовали.

Когда в системе культивирования присутствовали А-клетки интактного или иммунизированного подсвинка и неприкрепившиеся клетки от интактного животного, а сыворотка — от иммунизированного (№ 3 и № 7), накопление вируса АЧС снижалось на $1,34-1,83 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$. В указанной конфигурации накопление вируса ограничивалось антителозависимыми механизмами противовирусной защиты.

И, наконец, если в системе культивирования присутствовали А-клетки интактного или иммунизированного подсвинка одновременно с сывороткой и неприкрепившимися клетками белой крови, полученными от иммунизированного животного, накопление вируса АЧС в культуральных системах № 4 и № 8 снижалось по сравнению с контрольной (№ 1 и № 5) на $2,00-2,50 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$. В этой конфигурации действовали одновременно оба звена иммунной системы — клеточные (ЦТЛ) и антителопосредованные (АЗКЦ, КЗЦ).

Таким образом, на 6-е сут после иммунизации штаммом ФК-135 в

смоделированных системах антителоопосредованные противоклеточные механизмы превосходили ЦТЛ-опосредованные по способности ограничивать репродукцию вируса африканской чумы свиней. Судя по полученным результатам, ЦТЛ- и антителоопосредованные противоклеточные механизмы защиты действуют интегрированно, что позволяет предположить их направленность против различных эпитопов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Malmquist W.A. Serologic and immunologic studies with African swine fever virus. *American Journal of Veterinary Research*, 1963, 24: 450-459.
2. Ruiz-Gonzalvo F., Carnero M.E., Bruyel V. Immunological responses of pigs to partially attenuated African swine fever virus and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses. In: *African Swine Fever, EUR 8466 EN (Proceedings of CEC/FAO Research Seminar, Sardinia, Italy, September, 1981) /P.J. Wilkinson (ed.)*. Luxemburg, Belgium, Commission of the European Communities, 1981: 206-216.
3. Балышев В.М., Калантаенко Ю.Ф., Болгова М.В., Прудникова Е.Ю. Сероиммунологическая принадлежность вируса африканской чумы свиней, выделенного в Российской Федерации. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук, 2011, 5: 52-53.
4. Knudsen R.C., Genovesi E.V., Whyard T.C. In vitro immune serum-mediated protection of pig monocytes against African swine fever virus. *American Journal of Veterinary Research*, 1987, 48: 1067-1071.
5. Schlafer D.H., McVicar J.W., Mebus C.A. African swine fever convalescent sows: Subsequent pregnancy and the effect of colostral antibody on challenge inoculation of their pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 1984, 45: 1361-1366.
6. Рудобельский Э.В., Бадаев Ф.А., Чевелев С.Ф., Никишин И.В., Захаров В.М., Байбиков Т.З. Пассивный иммунитет у новорожденных поросят при африканской чуме свиней. *Ветеринария*, 1992, 1: 26-29.
7. Norley S.G., Wardley R.C. Complement-mediated lysis of African swine fever virus-infected cells. *Immunology*, 1982, 46: 75-81.
8. Norley S.G., Wardley R.C. Effector mechanisms in the pig. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of African swine fever virus infected cells. *Research in Veterinary Science*, 1983, 35: 75-79.
9. Середина А.Д., Соловкин С.Л., Фугина Л.Г., Макаров В.В. Иммуные реакции на вирус африканской чумы свиней. *Вопросы вирусологии*, 1992, 3: 168-170.
10. Sánchez-Vizcaíno J.M. African swine fever. In: *Diseases of swine /B. Straw, S. D'Allaire, J. Zimmerman, D. Taylor (eds.)*. 9th ed. Iowa State University Press, 2006: 291-298.
11. Norley S.G., Wardley R.C. Cytotoxic lymphocytes induced by African swine fever infection. *Research in Veterinary Science*, 1984, 37: 255-257.
12. Wardley R.C., Norley S.G., Martins C.V., Lawman M.J.P. The host response to African swine fever virus. *Progres en Virologie Medicale*, 1987, 34: 180-192.
13. Макаров В.В. Асимметрия эффекторного звена в противои инфекционном иммунитете (на примере африканской чумы свиней). *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*, 1996, 2: 33-35.
14. Середина А.Д., Балышев В.М. Антигенное разнообразие вируса АЧС. *Вопросы вирусологии*, 2011, 4: 38-42.

*ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии
и микробиологии Россельхозакадемии,
601120 Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров,
e-mail: sereda-56@mail.ru*

*Поступила в редакцию
5 марта 2013 года*

SIMULATION OF PROTECTIVE IMMUNE MECHANISMS AT AFRICAN SWINE FEVER *in vitro*

A.D. Sereda

S u m m a r y

Pigs that survive after infection with African swine fever virus are resistant to reinfection with seroimmunotype-homologous virulent isolates, indicating an immune protection development. Nevertheless, the points regarding the protective importance of various immune mechanisms at African swine fever still remain controversial. Peripheral blood leukocyte cultures prepared from both in-

tact or vaccinated pigs were used as models of implemented virus-specific reactions in vivo. The maximum amount of ASF virus was determined in the cultures with adherent cells from intact or immunized gilt, non-adherent white blood cells and the serum of an intact animal. Replacement of non-adherent cells from intact gilt by those from the immunized one led to a significant decrease in ASF virus titres. It was shown that combination of A-cells from intact or immunized gilt, non-adherent cells from the intact animal and the serum from immunized animal limited the viral propagation more strictly, under the replacement of non-adherent cells from the intact gilt by those from the immunized animal at the most. The results determine the role of cellular and humoral immunity in limiting African swine fever virus replication. The protection mechanisms mediated by cytotoxic T lymphocytes and antibody-mediated cellular anti-effectors are found to have an integrated effect, suggesting their targeting against different epitopes.

Вниманию читателей! Вышли в свет книги:

Марзанов Н.С., Ескин Г.В., Турбина И.С., Девришов Д.А., Тохов М.Х., Марзанова С.Н. Генодиагностика и распространение аллеля иммунодефицита, или VLAD-синдрома, у животных черно-пестрого скота. М.: изд-во ФГБНУ «Росинформагротех», 2013, 108 с.

Монография посвящена истории и современному состоянию нового направления в молочном скотоводстве — разработке методов диагностики молекулярных наследственных болезней. За основу взят дефицит лейкоцитарной адгезии, или VLAD-синдром, у крупного рогатого скота. В книге описаны мероприятия по ветеринарно-медицинскому консультированию специалистов при выявлении элиминации мутантного аллеля в племенных хозяйствах и в процессе оценки животных при отборе и покупке быков-производителей и быковоспроизводящих коров, приведены данные по методам генетико-генеалогического анализа на основе достижений ДНК-технологии. Проводится анализ материала, полученного как отечественными, так и зарубежными учеными. Монография включает введение, пять глав, заключение и обширный список использованной литературы. Издание предназначено для генетиков, иммунологов, селекционеров, специалистов в области животноводства, преподавателей, аспирантов, студентов высших учебных заведений сельскохозяйственного и биологического профиля (рецензенты — доктор сельскохозяйственных наук, профессор А.В. Бакай, кандидат сельскохозяйственных наук Ю.В. Саморуков).

Марзанов Н.С., Амерханов Х.А., Марзанова Л.К., Кантанен Ю., Озеров М.Ю., Петров С.Н., Марзанова С.Н. Эволюция и генная технология в тонкорунном овцеводстве: научное издание. М.: изд-во ФГБНУ «Росинформагротех», 2012, 174 с.

Научное издание посвящено вопросам разработки и использования генной технологии в тонкорунном овцеводстве Российской Федерации и за рубежом, возможностям использования различных типов генетических маркеров (группы крови, полиморфные белки, микросателлиты) в решении породоведческих вопросов. В нем даны характеристики различных пород тонкорунных овец, разводимых в Российской Федерации, в странах СНГ и дальнего зарубежья. На большом материале представлены современные проблемы и состояние изученности генетики мериносов с учетом экологических факторов. Монография охватывает историю и эволюцию становления тонкорунного овцеводства в Российской Федерации и в мире, уделено внимание происхождению термина «меринос». Обсуждаются решения конкретных селекционных и генетических задач. Научное издание включает введение, три главы, заключение и библиографию. Оно рассчитано на генетиков, селекционеров, специалистов в области животноводства, преподавателей, аспирантов и студентов зоотехнических, ветеринарных и биологических факультетов. Издание будет полезно в качестве учебного пособия для слушателей системы аграрного дополнительного профессионального образования. Представленные материалы позволяют ознакомиться не только с теорией, но и с практикой изучаемого вопроса в тонкорунном овцеводстве.

Новые книги

Штеле А.Л., Османян А.К., Афанасьев Г.Д. **Яичное птицеводство.** СПб: изд-во «Лань», 2011, 272 с.

В книге рассмотрены все звенья технологического процесса производства яиц на промышленной основе, включая особенности получения обогащенных яиц с заданными свойствами. В рамках учебной программы приведены основные сведения о яичной продуктивности и качестве пищевых яиц, яичных и мясо-яичных породах, по инкубации яиц. Излагаются генетические осно-

вы селекции, приводятся методы выведения линий и кроссов, особенности селекционно-племенной работы в яичном птицеводстве; даны рекомендации по кормлению, выращиванию и содержанию яичных пород кур, применению современного технологического оборудования. В отдельной главе описана технология производства перепелиных яиц. Рекомендуется для студентов высших учебных заведений по направлению подготовки «Зоотехния» и для студентов, обучающихся по двум уровням образования: бакалавриат и магистратура.