

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ
ім. Л.В. ГРОМАШЕВСЬКОГО

На правах рукопису

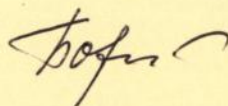
БОРИСОВА Олена Вадимівна

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ВІРУЛЕНТНОСТІ
ТА ІМУНОСУПРЕСІВНОСТІ У
SHIGELLA SONNEI

03.00.07 - мікробіологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1997



579



00751897 (.)

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Київському НДІ епідеміології та інфекційних хвороб МОЗ України

Наукові керівники - доктор медичних наук,
професор А.М.Зарицький

доктор медичних наук,
професор В.М.Бондаренко

Офіційні опоненти - доктор медичних наук
А.В. Шапіро

доктор біологічних наук,
професор М.Я. Співак

Провідна установа - Київська медична академія післядипломної освіти

Захист дисертації відбудеться "13" травня 1997 р. о ___ год.
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д-50.22.02 при
Київському НДІ епідеміології та інфекційних хвороб ім.
Л.В.Громашевського МОЗ України (252038 Київ, узвіз
Протасів Яр, 4).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці інституту

Автореферат розісланий "10" квітня 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
канд. мед. наук

Л.С.Красюк

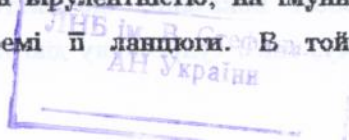
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

В літературі вже давно висловлюється думка про те, що одним із шляхів реалізації патогенних властивостей у бактерій є їх вплив на імунну систему (Покровский В.И. и др., 1990; Николаева Т.Н., Бондаренко В.М., 1995; Kaufmann S.H.E., 1993). Вважають, що здатність мікроорганізмів притуплювати реакцію імунної системи сприяє їх виживанню в організмі хазяїна (Gupta R.K., Prasad D.N., 1990; Nordau C.-G., 1992).

Щодо шигел, то відомо, що вірулентні штами відрізняються від невірулентних не тільки здатністю проникати в клітини і розмножуватися в них, але й більш суттєво змінювати реакцію імунної системи (Белая Ю.А., 1988; Николаева Т.Н. и др., 1995). З цього питання одержані досить суперечливі результати. З одного боку, існують дані про те, що шигели посилюють імунну відповідь, при цьому вірулентні шигели більш імуногенні, ніж авірулентні (Николаева Т.Н., Белая., 1992). З іншого боку, є дані про те, що вірулентні шигели пригнічують вторинну імунну відповідь, імунну пам'ять (Фролов А.Ф., Борисов В.А., 1986; Фролов А.Ф., Борисов В.А., 1988).

Носієм імуносупресивної активності вірулентних шигел, можливо, є ліпополісахарид (Борисов В.А., 1988), який складає основну частину ендотоксину грамнегативних бактерій (Варбанец Л.Д., 1994; Burrell R., 1990; Rietschel E.T., Brade H., 1992). Нажаль, усі ці суперечливі дані були одержані в експериментах, основним завданням яких було вивчення впливу шигел, опозитних за вірулентністю, на імунну систему організму-хазяїна, на окремі її ланцюги. В той же час



імуносупресивна активність шигел як властивість бактерій, а також її зв'язок з інвазивністю і роль ліпополісахариду в її формуванні, вивчені недостатньо. В цьому напрямку були неповністю використані експериментальні можливості: широке коло експериментальних моделей шигельозної інфекції, максимально очищені препарати, генетичні моделі.

Необхідність подальшого дослідження імуносупресивних властивостей шигел, зв'язаних з вірулентністю, визначається широким розповсюдженням шигельозів, важливістю патогенних властивостей мікроорганізму в інфекційному та епідемічному процесі, необхідністю одержання нових даних для розробки засобів імунологічної профілактики.

Вище зазначене послужило основою для проведення цих досліджень.

Мета роботи. Вивчення зв'язку імуносупресивної властивості з вірулентністю у *Shigella sonnei* і визначення ролі ліпополісахариду (ЛПС) у формуванні імуносупресивної властивості.

Задачі роботи.

1. Вивчити особливості впливу вірулентних шигел на формування антитільної та клітинної імунної відповіді на експериментальних моделях.
2. Вивчити генетичну детермінованість імуносупресивної властивості вірулентних шигел.
3. Вивчити роль ЛПС у формуванні імуносупресивної властивості вірулентних шигел.

Наукова новизна роботи.

В роботі показано, що шигели можуть виявляти як стимулюючу, так і супресивну дію на імунну систему в умовах

експериментальної шигельозної інфекції у тварин. Імуностимулюючу дію можуть проявляти як вірулентні, так і невірулентні шигели, хоч у перших ця властивість більш виражена. Стимуляція стосується як первинної, так і вторинної імунної відповіді і не являється постійною ознакою. Імуносупресивну дію проявляють тільки вірулентні бактерії і тільки при вторинній гуморальній та клітинній імунній відповіді. Ця дія несе постійний характер та має місце при використанні різних моделей експериментальної шигельозної інфекції.

Виявлений абсолютний та прямий зв'язок між інвазивністю та імуносупресивністю у вірулентних *Shigella sonnei*. Обидві властивості визначаються генами інвазивності на плазміді вірулентності з м.м. 120 MD. Пропонується під терміном "імуносупресивність шигел" розуміти здатність пригнічувати імунну пам'ять, вторинну імунну відповідь.

В результаті кращення високоочищених імуноафінних препаратів ЛПС вірулентних і невірулентних *S. sonnei* встановлено, що ЛПС приймає участь у формуванні імуносупресивності та інвазивності вірулентних штамів. ЛПС вірулентних шигел на відміну від ЛПС невірулентних має індуктивну імуносупресивну властивість. Вона виявляється в тому, що невірулентні шигели при введенні експериментальним тваринам разом з ЛПС вірулентних шигел набувають властивість пригнічувати вторинну імунну відповідь. В ЛПС вірулентних бактерій виявлені три фракції, які відрізняються за молекулярною масою і індуктивною імуносупресивною активністю.

Розроблено принцип одержання ЛПС з вірулентних бактерій із зберіганням його індуктивною імуносупресивною властивості. Цей принцип базується на використанні імуносорбентів або додаткової хімічної обробки неактивних в цьому відношенні препаратів ЛПС, одержаних водно-феноловим і трихлороцтовим методом.

Практичне значення роботи.

Практичний інтерес представляють матеріали по вивченню генетичної детермінованості імуносупресивності вірулентних шигел. Ці матеріали дозволяють сформулювати положення про тісний зв'язок вірулентності та імуносупресивності у шигел, про те, що одним із шляхів реалізації їх патогенності є пригнічення імунної системи.

Практичне значення мають матеріали по розробці принципів одержання ЛПС з вірулентних шигел, що дозволять отримувати препарат в нативному стані. Одержання ЛПС з вірулентних шигел є необхідним при розробці нових імуногенних препаратів.

Основні положення, що виносяться на захист.

1. Патогенність *S. sonnei* проявляється не тільки у вигляді вже відомих елементів - адгезивності, інвазивності, токсичності, - але й у вигляді імуносупресивності, тобто здатності пригнічувати імунну пам'ять, вторинну імунну відповідь.
2. Інвазивність і імуносупресивність вірулентних шигел мають між собою тісний зв'язок, оскільки детермінуються одними й тими ж генами інвазивності на плазміді вірулентності.
3. ЛПС вірулентних шигел приймає участь у формуванні таких властивостей бактерій, як імуносупресивність і інвазивність. Від

ЛПС невірулентних бактерій він відрізняється більш високою імуногенністю, ад'ювантністю, адгезивністю, токсичністю.

4. Розроблені принципи одержання ЛПС вірулентних *S.sonnei* із зберіганням його відмітних біологічних властивостей, в тому числі й індуктивної імуносупресивності, використовуючи імуносорбенти та редокс системи.

Впровадження результатів роботи.

Викладені в дисертації матеріали використовуються при читанні нормативного курсу лекцій "Імунологія", спецкурсів "Імунопатологія" та "Інфекційний процес" для студентів біологічного факультета Національного університету ім.Тараса Шевченка.

Апробація роботи та публікації.

За матеріалами роботи надруковано 11 наукових праць, з них 3 статті у журналах. Матеріали дисертації були викладені та обговорені на VII Європейському Симпозіумі з Вуглеводів, Польща, Краків, 1993; на науковому симпозіумі по формуванню психологічних і фізіологічних функцій організму, Україна, Черкаси, 1995; на наукових конференціях для викладачів, аспірантів та студентів Національного університету ім.Т.Шевченка, 1995, 1996; на захистах курсових та дипломної роботи в 1994, 1995, 1996 рр.

Обсяг і структура дисертації.

Дисертація складається із вступу, двох розділів огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, чотирьох розділів власних досліджень, обговорення результатів, висновків, списку літератури, який містить 235 найменувань, з них 140 іноземних. Основний текст викладено на 138 сторінках, ілюстрований 13 рисунками, 16 таблицями.

Особистий внесок у розробку наукових результатів.

Всі результати одержані особисто автором або з його безпосередньою участю.

ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження

В роботі використовували вірулентний, що викликає кератокон'юнктивіт у морських свинок, штам *Sigella sonnei* 877B і 256B та їх авірулентні мутанти 877A і 256A. Культури цих штамів при рості на щільному агаровому середовищі давали переважно круглі колонії (S-форма), і аглютинувалися O-специфічною сироваткою до *S. sonnei* (Борисов В.А., Фролов А.Ф., 1990).

В генетичних дослідженнях використовували мікробні клітини чотирьох генетично зв'язаних штамів. Перша пара складалася з вірулентного штаму *S. sonnei* 941-HP(pSS120+) I фази, який містить плазмиду вірулентності, та його авірулентного похідного *S. sonnei* 941-HP(pSS120-) II фази. Друга пара складалася з авірулентного штаму *S. sonnei* NR-18(pSS120+::Tn5) I фази, що мав плазмиду вірулентності, в яку був введений блокуючий ген інвазивності транспозон Tn5, а також авірулентного штаму *S. sonnei* NR-18(pSS120-) II фази. В дослідках використовувались також перебуваючі в S-формі невірулентні штами *Escherichia coli* кількох серотипів, *S. flexneri* 516A, *Salmonella minnesota* 595Re, *Pseudomonas aeruginosa* 140R та інші (Борисов В.А. и др., 1993).

Безмікробні фільтрати бульйонної культури (ФК) шигел готували за відомим способом (Борисов В.А., 1988).

Імуноафінні препарати ліпополісахаридів (ЛПС) одержували, використовуючи імуносорбенти з антитіл до O-

антигену *S. sonnei* (Борисов В.А., 1988). Бодно-феноловий ЛПС отримували з бактерій, використовуючи модифікацію цього методу (Кульшин В.А. и др., 1987). Препарати ЛПС тестували за методом Лоурі для виявлення білків, антроновим методом для визначення гексоз.

Використовували обробку препаратів ЛПС фенолом, трихлороцтовою кислотою, редокс системою, нагріванням (Борисов В.А., Фролов А.Ф., 1990; Mc Millan I.D., 1990).

Визначали також імуногенність, ад'ювантність, токсичність ЛПС, його здатність осідати на еритроцитах барана і розчинність у воді (Gupta R.K. et al, 1991; Barakett V. et al, 1992).

ЛПС піддавали також гельфільтрації через колонку сефадекса (Борисов В.А., 1988) і вертикальному електрофорезу в поліакріламідному гелі у присутності додецилсульфату натрія з фарбуванням нітратом срібла і Coomassi-R250 (Chart H. et al, 1995).

У дослідях використовували мишей лінії Balb/C, СВА, СС57W та морських свинок.

Застосовували моделі експериментального шигельозу у морських свинок - кератокон'юнктивіт і цистит - та у мишей - пневмонія, внутрішньочеревинне і внутрішнє зараження (Тимаков В.Д. и др., 1980). Наявність інфекції контролювали патоморфологічним і мікробіологічним методом.

Для визначення особливостей вірулентних *S. sonnei* і впливу шигельозної інфекції на імунну відповідь використовували різні моделі імунної відповіді.

Первинну антигільну імунну відповідь у морських свинок викликали введенням еритроцитів барана в дозі 5×10^5 клітин.

Первинну антитільну імунну відповідь у мишей викликали внутрішньочеревинним введенням Vi-антигену *Salmonella typhi* в дозі 0.1 мкг. Антитіла в крові визначали в реакції маєаглютинації через 7 днів після імунізації.

Вторинну гуморальну імунну відповідь до цих антигенів викликали таким же чином, але в досліді брали тварин, які були за 3-4 тижня перед дослідом імунізовані неімуногенною дозою або формою цих самих антигенів для створення імунної пам'яті.

Для оцінки клітинної імунної відповіді використовували гіперчутливість сповільненого типу (ГСТ), яку викликали у мишей введенням інактивованих спленоцитів морської свинки. ГСТ виконували в модифікації припухлості подушечки задньої лапки (Борисов В.А., 1988). Первинне або вторинне вирішальне введення антигену проводили на фоні розвинутої шигельозної інфекції або одночасно з зараженням шигелами.

Результати дослідів обробляли статистичними методами.

Результати досліджень та їх обговорення
Імуномодуюча активність *Shigella sonnei*, що відрізняється за вірулентністю, при експериментальній шигельозній інфекції.

Виявлено, що первинна імунізація Vi-антигеном *Salmonella typhi* мишей, у яких була створена шигельозна пневмонія інтраназальним введенням вірулентних *Shigella sonnei*, супроводжується більш інтенсивним утворенням антитіл у порівнянні з формуванням їх у мишей, неінфікованих або інфікованих невірулентними шигелами, які пневмонію не викликали (рис.1а).

При повторній імунізації Vi-антигеном на фоні пнigelьозної пневмонії виявлено, що рівень антитіл у тварин не мав достовірно значимих відмінностей від його рівня у інфікованих невірулентними пнigelами і у неінфікованих мишей. Але при порівнянні кількості антитіл при первинній і вторинній імунній відповіді виявлено достовірне їх наростання у мишей неінфікованих і інфікованих невірулентним штамом. Якщо мишей інфікували вірулентним штамом, достовірного наростання рівня антитіл після вторинної імунізації Vi-антигеном не відмічається. Оскільки за умовами експеримента в дослід брали тварин з проконтрольованою імунною пам'яттю, одержані результати свідчать про недостатню реалізацію пам'яті при пнigelьозній пневмонії.

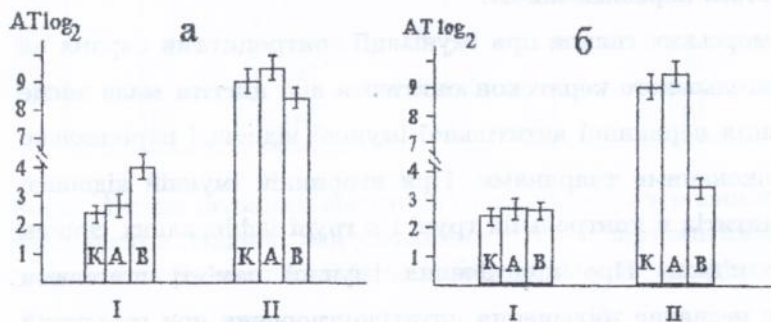


Рис.1. Вплив пнigelьозної пневмонії (а) і перитоніта (б) на формування антитіл (Ат) до Vi-антигену при первинній (I) і вторинній (II) імунній відповіді.

К, А, В, - рівень антитіл у мишей неінфікованих, інфікованих авірулентними і вірулентними штамами пнigel.

При внутрішньочеревинній імунізації мишей пнigelами рівень антитіл у відповідь на первинну імунізацію Vi-антигеном не мав відмін в групах тварин, інфікованих невірулентними,

вірулентними бактеріями, і в контрольній групі неінфікованих мишей (рис.1б). Вторинна імунна відповідь виявлялася рівнозначним рівнем Vi-антитіл у неінфікованих мишей і інфікованих авірулентним штамом.

Виявляється значно знижений рівень антитіл у мишей, інфікованих вірулентними шигелами. Порівняння результатів вторинної і первинної імунізації Vi-антигеном зазначає, що ефект реімунізації, що вказує на реалізацію імунної пам'яті до Vi-антигену, проявляється у неінфікованих тварин і інфікованих невірулентними шигелами. У випадку імунізації тварин, інфікованих вірулентним штамом, рівень Vi-антитіл після первинної і після вторинної імунізації Vi-антигеном не мав значних відмін. Це свідчить про те, що імунна пам'ять залишається нереалізованою.

У морських свинок при імунізації еритроцитами барана на фоні шигельозного кератокон'юнктивіта або цистита мала місце стимуляція первинної антитільної імунної відповіді порівняльно з неінфікованими тваринами. При вторинній імунній відповіді рівень антитіл в контрольній групі і в групі інфікованих свинок не мав відмін. Про пригнічення імунної пам'яті шигелами свідчило незначне збільшення антитілоутворення при вторинній імунізації еритроцитами барана.

На моделі гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) до небактеріального антигену встановлено, що вірулентні шигели на відміну від невірулентних пригнічують клітинну імунну реакцію при усіх способах інфікування шигелами - інтраназально, внутрішньочеревно, внутрішньо (рис.2).

Результати досліджень свідчать, що для вивчення імуностимулюючої активності вірулентних шигел краще

використовувати модель первинної антитільної імунної відповіді і зараження шигелами слизових оболонок - кератокон'юнктивіт і цистит у морських свинок, пневмонія у мишей. Для вивчення імуносупресивної властивості вірулентних шигел, що полягає в здатності пригнічувати імунну пам'ять, придатні моделі тільки вторинної імунної відповіді. Перевагу слід віддати клітинній відповіді у вигляді реакції ГСТ у мишей і внутрішньочеревинному зараженню шигелами. В цих умовах досліда імуностимулююча властивість шигел не проявляється.

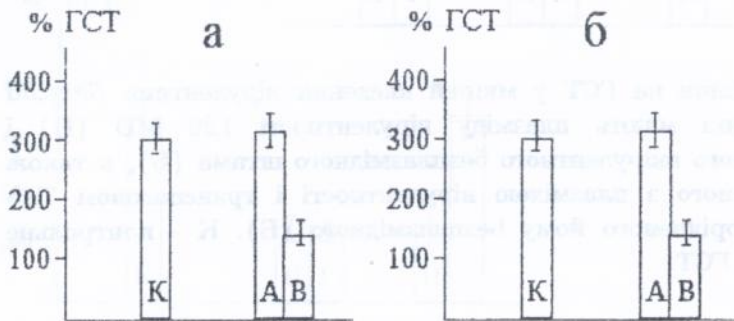


Рис.2. Вплив інтраназального (а) і внутрішньочеревинного (б) інфікування мишей авірулентними (А) і вірулентними (В) *S. sonnei* на реалізацію ГСТ до небактеріального антигену.

Вивчення імуносупресивної активності *Shigella sonnei*, що відрізняються за наявністю плазмід рSS120.

Виявлено, що ГСТ до небактеріального антигену у мишей пригнічується при внутрішньочеревинному введенні *Shigella sonnei* вірулентного штаму, який має плазмиду вірулентності 120 MD. Його генетичний похідний невірулентний штаму, який не має плазмиду 120 MD, не пригнічував ГСТ (рис.3).

Введення шигел іншого штаму, невірулентного, з плазмидою вірулентності, гени інвазивності якої блоковані

транспозоном Tn5, теж не викликало пригнічення ГСТ у мишей, як і введення спорідненого для нього штаму шигел, що втратив плазмиду 120 MD.

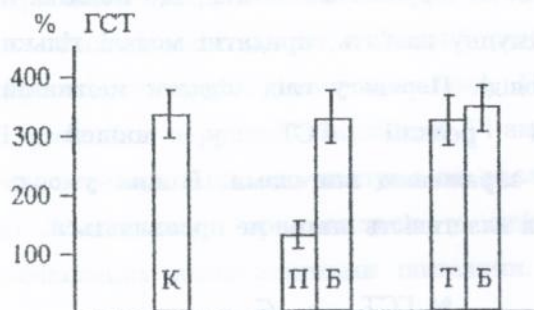


Рис.3. Вплив на ГСТ у мишей введення вірулентних *Shigella sonnei*, які мають плазмиду вірулентності 120 MD (П) і спорідненого авірулентного безплазмідного штама (Б), а також авірулентного з плазмидою вірулентності і транспозоном Tn5 (Т) і спорідненого йому безплазмідного (Б). К - контрольне значення ГСТ.

Це свідчить, що імуносупресивна властивість шигел визначається плазмидою вірулентності, а точніше генами інвазивності цієї плазмиди. Елімінація генів інвазивності або їх блокада веде до втрати інвазивності і імуносупресивності бактерій. Таким чином, встановлений абсолютний зв'язок інвазивності і імуносупресивності. Обидва ці феномена слід віднести до безумовних проявлень вірулентності шигел, до елементів їх патогенності.

Фільтрати культуральної рідини (ФК) при внутрішньочеревинному введенні мишам не впливали на рівень ГСТ, як і невірулентні *S. sonnei* і *E. coli* O111. Але якщо ФК і бактерії вводили разом, то показник ГСТ різко знижувався при

використанні ФК вірулентного штаму з плазмідною вірулентністю 120 MD. ФК усіх інших штамів шигел не надавали бактеріям імуносупресивної властивості. Для проявлення ефекту бактерії повинні були бути живими. Результати цих досліджень свідчать про наявність в ФК вірулентних шигел фактора, який індукує у бактерій імуносупресивну властивість - індуктивного імуносупресивного фактора. В дослідях з *S. sonnei* фактор виявляв термостабільну активність, а з *E. coli* - термолабільну (рис.4).

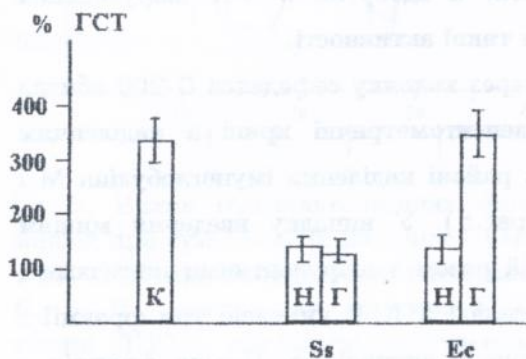


Рис.4. Рівень GST у мишей (К - контрольний) при внутрішньочеревинному введенні невірулентних *S. sonnei* (*Ss*) і *E. coli* (*Ec*) разом з нативним (Н) і грітним (Г) ФК вірулентних шигел.

Активність фактора ФК ліквідувалася після обробки ФК фенолом або трихлороцтовою кислотою. З іншого боку, після обробки редокс системою ФК невірулентних бактерій набували індуктивну імуносупресивну активність. Ці дані свідчать, що індуктивна імуносупресивна активність ФК визначається генами інвазивності, але детермінується не синтез фактора, а тільки його активація.

В літературі є непрямі доведення того, що активний фактор ФК є екстрацелюлярним ліпополісахаридом (ЛПС) *S. sonnei*. Але дослідження очищених препаратів ЛПС не проводили.

Індуктивна імуносупресивна активність імуоафінних ліпополісахаридів вірулентних та невірулентних *Shigella sonnei*.

Виявлено, що одержаний за допомогою імуносорбенту з ФК вірулентного штаму *S. sonnei* ЛПС-В проявляє імуносупресивну активність, а здобутий з ФК авірулентних шигел ЛПС-А не проявляє такої активності.

При гельфільтрації через колонку сефадекса G-200 обидва ЛПС утворюють схожі денситометричні криві з виділенням основної маси речовини в районі виділення імуноглобуліна М і G людської сироватки (рис.5). У випадку введення мишам гельфільтраційних фракцій разом з авірулентними шигелами і кишковими паличками в складі ЛПС-В виявлені три фракції з індуктивною імуносупресивною активністю. Перша фракція з м.м. вище 800 kD проявляє термолабільну активність надавати імуносупресивність тільки *S. sonnei*, тобто має специфічність. Друга фракція з м.м. 200-150 kD також індукує імуносупресивність тільки у *S. sonnei*, виявляючи специфічність, але термостабільна. Третя фракція з м.м. 30-70 kD є термолабільною і неспецифічною, оскільки індукує імуносупресивність у багатьох бактерій - невірулентних *S. sonnei*, *S. flexneri*, *E. coli* різних сероварів.

ЛПС-А не індукує у невірулентних бактерій імуносупресивну властивість. Але після редокс обробки в його складі методом гельфільтрації виявляються усі три активні

фракції. Після обробки фенолом або трихлороцтовою кислотою активність усіх фракцій ЛПС-В і редокс активованого ЛПС-А повністю ліквідувалась. Експерименти показали, що процес активування і інактивування може бути здійснений багаторазово.

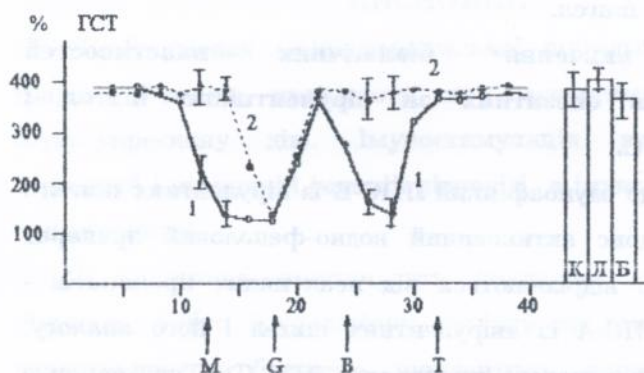


Рис.5. Вплив гел'фільтраційних фракцій ЛПС-В на ГСТ у мишей при сумісному їх введенні з невірулентними *S.sonnei*. 1 і 2 - ГСТ при використанні нативних і грітих фракцій К, Л, Б - контрольне значення ГСТ, а також при введенні тільки ЛПС-В, або тільки невірулентних шигел.

На прикладі препарату ЛПС, екстрагованого з невірулентних *S.sonnei* 9090 водно-феноловим методом Вестфалія показано, що препарат не виявляє індуктивної імуносупресивної активності. Але цю активність він набуває після редокс обробки. Методом гел'фільтрації в ньому виявляються три активні фракції, характерні для ЛПС вірулентних *S.sonnei*.

Таким чином, за індуктивною імуносупресивною активністю водно-феноловий екстракт може бути віднесений до аналогів ЛПС невірулентних шигел, а редокс активований його варіант - до аналогів ЛПС вірулентних *S.sonnei*. Результати

цих досліджень остаточно доводять, що індуктивний імуносупресивний фактор фільтрата культури *S. sonnei* є ліпополісахаридом особливої модифікації. Ця модифікація ЛПС може бути одержана за результатами хімічної обробки. Така обробка може стати основою для простого способу одержання ЛПС вірулентних шигел.

Порівняльне вивчення біологічних властивостей ліпополісахаридів опозитних за вірулентністю шигел і аналогів цих ЛПС.

Виявлено, що імуноафінний ЛПС-В із вірулентних шигел і його аналог, редокс активований водно-феноловий препарат (ЛПС-Р), значно відрізняються від неактивних препаратів - імуноафінного ЛПС-А із авірулентних шигел і його аналогу, вихідного водно-фенолового препарату, ЛПС-Ф. Так, перші з них - ЛПС-В і ЛПС-Р - мають здатність значно посилювати рівень бактеріємії, викликаної у мишей внутрішньочеревним введенням невірулентних *S. sonnei*. Препарати ЛПС при цьому вводили одночасно з шигелами. Неактивні препарати - ЛПС-А і ЛПС-Ф - не посилюють бактеріємію в умовах такого ж досліда.

Крім того, препарат вірулентних шигел (ЛПС-В) і його аналог ЛПС-Р виявляли порівняльно з препаратом невірулентних шигел (ЛПС-А) і його аналогом ЛПС-Ф більш високу адгезивність в дослідах з еритроцитами барана, імуногенність для мишей, ад'ювантність, знижену протективність, більш високу активність в LAL-тесті і меншу розчинність у воді. Ці дані свідчать про широкі відмінності екстрацелюлярного ЛПС вірулентних шигел на відміну від ЛПС невірулентних.

Проте, при електрофорезі в поліакріламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію водно-фенолового неактивного ЛПС-Ф і редокс активованого ЛПС-Р не виявлено яких-небудь відмін між ними. Це може вказувати на тонкі зміни в молекулі ЛПС в процесі його активування.

ВИСНОВКИ

1. В умовах експериментальної шигельозної інфекції у тварин *S. sonnei* виявляють як імуностимулюючу, так і імуносупресивну дію. Імуностимуляція виявляється при первинній і вторинній імунній відповіді, а імуносупресія - тільки при вторинній.

2. Здатність пригнічувати виключно вторинну імунну відповідь, тобто імунологічну пам'ять до різних антигенів є характерною особливістю вірулентних шигел; невірулентні штами цією властивістю не володіють. Імуносупресивна властивість вірулентних *S. sonnei* детермінується, як і інвазивність, генами інвазивності на плазміді вірулентності.

3. Носієм імуносупресивної активності вірулентних *S. sonnei* є їх ліпополісахарид, що міститься у фільтраті культури бактерій і може бути здобутий з нього імуносорбентом з О-антигін. Встановлено, що імуноафінний ЛПС вірулентних шигел відрізняється від ЛПС невірулентних шигел здатністю надавати імуносупресивну активність невірулентним шигелам та кишковим паличкам.

4. Індуктивно-імуносупресивна властивість ЛПС вірулентних *S. sonnei* представлена трьома активностями - специфічною термолабільною (ЛПС з м.м. 800 кД та вище), специфічною термостабільною (ЛПС з м.м. біля 150 кД) та неспецифічною термолабільною (ЛПС з м.м. біля 70 кД).

5. Встановлена можливість переводу ЛПС з активної форми в неактивну та зворотно завдяки редокс-обробці. Це створює підставу для розробки метода отримання активного ЛПС в значних кількостях.

6. Препарати ЛПС невірулентних і вірулентних штамів, що одержані імуносорбентним методом, а також хімічно модифіковані їх аналоги (фенольний і редокс оброблений ЛПС) відрізняються не тільки індуктивною імуносупресивною властивістю, але й рядом інших властивостей: розчинністю в воді, пірогенністю, адгезивністю, імуногенністю, ад'ювантністю і властивістю підтримувати бактеріємію.

7. Результати проведених досліджень дозволяють віднести імуносупресивність *S. zoppei* до елементів патогенності поряд з вже відомими - адгезивністю, інвазивністю, токсичністю.

СПИСОК РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Борисов В.А., Борисова О.В. Неспецифічний імуносупресорний фактор селезінки, що індукується у мишей імунізацією бактеріями. - Физиологический журнал, 1993, №2-3, с.48-52.
2. Борисов В.А., Борисова Е.В., Соловьева Г.А. Влияние шигелл на гиперчувствительность замедленного типа у мышей при разных способах инфицирования. - Мікробіологічний журнал, 1994, №3, с.55-59.
3. Борисова Е.В., Борисов В.А. Индуктивно-иммуносупрессивная активность неспецифической фракции липополисахарида вирулентных шигелл Зонне.- Мікробіологічний журнал, 1997, №1, с.77-81.
4. Борисова Е.В., Черникова М.Ю., Борисов В.А. Реакция иммунной системы мышей на модифицированные

липополисахариды шигелл. - Депонирована в ВИНТИ 30.11.1995, №3171-В95. - РЖБ, 1996, №5, 04Б4.367.

5. Борисова О.В. Роль низькомолекулярного ендотоксина шигелл Зонне в регуляції імунної відповіді. - Матеріали Симпозіуму "Особливості формування та становлення психофізіологічних функцій в онтогенезі". Київ - Черкаси, 1995, с.9.

6. Борисова О.В. Походження імунодефіцитного стану при шигельозах. - XII з'їзд Українського наук. товариства мікробіол., епідеміол. та паразитол. Тези. Київ - Вінниця, 1996, с.60.

7. Borisov V.A., Borisova E.V. Protective and immunosuppressive effect of *Shigella sonnei* lipopolysaccharide. - International Conference "Vaccines for Enteric Diseases". Abstracts. Cambridge, England, 1992. - Vaccines, 1992, v.10, N4, p.285.

8. Borisova E.V., Borisov V.A. The immunomodulation processes in the *Shigella*-infected animals. - 12th European Immunology Meeting. Abstracts. Barselona, Spain, 1994, W43/66, p.394.

9. Borisova E.V., Chernikova M.Y., Borisov V.A. Immunoaffinity lipopolysaccharide of virulent *Shigella sonnei* and its immunobiological peculiarities. - XIII International Symposium on Glycoconjugates. Abstracts. Seattle, USA, 1995, p.450.

10. Molozhavaya O.S., Borisova E.V., Borisov V.A. The location of chemical groups with immunosuppressive activity in bacterial lipopolysaccharide. - XVIII International Carbohydrate Symposium Abstracts. Milane, Italy, 1996, p.569.

11. Borisova E.V., Borisov V.A. The connection of immunological properties of lipopolysaccharide with bacteria virulence. - IV Jenner Intern. Meeting. Abstracts. Loutraki, Greece, 1996, p.56.

АНОТАЦІЇ

Борисова Елена Вадимовна "Взаимосвязь вирулентности и иммуносупрессивности у *Shigella sonnei*"

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07- микробиология. Киевский НИИ эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В.Громышевского. Киев, 1997.

Показано, что экспериментальная шигеллезная инфекция сопровождается иммуностимулирующим и супрессивным эффектом. Иммуносупрессивное свойство проявляется только вирулентными штаммами и подавляется только вторичный иммунный ответ, иммунная память. Супрессивность определяется генами инвазивности. Носителем этого свойства шигеллы является липополисахарид. В составе ЛПС вирулентных шигеллы обнаружены три активные фракции.

Borisova E.V. The mutual connection of virulence and immunosuppressive activity in *Shigella sonnei*

The thesis for degree of Philosophy Doctor in speciality 03.00.07 - microbiology. Gromashevsky Research Institute of Epidemiology and Infectious Diseases. Kiev, 1997.

It has been shown that experimental *Shigella* infection expresses as immunostimulant and suppressive effect. Only virulent strains express the immunosuppressive property, they inhibit immune memory and the secondary immune response. Suppressive ability is determined by invasiveness genes. Lipopolysaccharide of virulent *Shigellae* is the inductor of this property. There are three active fractions in virulent strain LPS.

Ключові слова: *Shigella sonnei*, вирулентність, плазмідна вирулентності, імуносупресивність, ліпополісахарид.

Підписано до друку 08.04.97р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.
Наклад 100. Зам. 102.

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86

43507-

AB 37.465