

DOI: 10.26693/jmbs05.01.050

УДК 579.871.1:612.017.12:57.083.3:612.112.3

Єлисеєва І. В., Ждамарова Л. А., Білозерський В. І.,
Колпак С. А., Балак О. А.

ВИВЧЕННЯ ДИНАМІКИ ФАГОЦИТАРНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛІВ ПІСЛЯ ПОВТОРНИХ ЩЕПЛЕНЬ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ДИФТЕРІЙНИМ БАКТЕРІАЛЬНИМ АНТИГЕННИМ ПРЕПАРАТОМ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України»,
Харків, Україна

babych_em@ukr.net

Метою роботи було показати можливі прояви «імунологічної пам'яті» нейтрофілів як популяції клітин системи уродженого імунітету при дослідженні динаміки активності фагоцитозу тест-об'єкту *C. diphtheriae var. gravis, tox+* після повторних стимулів імунної системи піддослідних кролів експериментальним дифтерійним бактеріальним антигенним препаратом. Препарат одержували авторським способом. Фагоцитарну активність нейтрофілів у кролячій крові досліджували прямим морфологічним методом напередодні введення досліджуваного препарату та на другий день, через 3 години після кожного щеплення. Дослідний бактеріальний дифтерійний антигенний препарат суттєво стимулював фагоцитарну активність нейтрофілів у кролячій крові після першого, другого і третього щеплення. Середні значення показників активності фагоцитозу після усіх трьох щеплень були суттєво вищими за середні рівні напередодні антигенних стимулів ($t > 2, p = 0,05$). Збільшення кількості поглинутих мікробних клітин при повторних щепленнях забезпечувалося не збільшенням кількості фагоцитуючих нейтрофілів, а підвищенням їх ефективності. Повторна вакцинація забезпечувала як підвищену готовність нейтрофілів до поглинання мікробних клітин, так і більший рівень їх реагування ($t > 2, p = 0,05$). Одержані результати експерименту можна пояснити з позицій концепції про тренований уроджений імунітет та епігенетичне перепрограмування клітин уродженого імунітету. Збільшення показників фагоцитозу напередодні повторних щеплень і після них може свідчити про збереження інформації клітинами системи уродженого імунітету про антигенний стимул, одержаний при першому введенні досліджуваного препарату. Одержані результати є перспективними для конструювання комбінованої дифтерійної вакцини з бактеріальним компонентом, спрямованої на попередження коло-

нізації збудником слизових оболонок респіраторно-го тракту і токсичних форм дифтерії.

Ключові слова: уроджений імунітет, нейтрофіли, фагоцитоз, дифтерійний бактеріальний антиген, дифтерійна вакцина.

Зв'язок роботи з науковими роботами, планами, темами. Дослідження проводилися відповідно до теми науково-дослідної роботи «Визначити вплив кашлюково-дифтерійних антигенів на клітинно-опосередкований імунітет та обґрунтувати концептуальні положення створення вакцин у форсуючому режимі», № держ. реєстрації 0117U002276.

Вступ. За два останніх десятиріччя експоненційно зросла кількість публікацій, які відображають дослідження вродженого імунітету та захисних механізмів, які лежать у основі його функціонування [1-3]. Вроджена імунна система є другою лінією захисту від мікробної інфекції у хребетних та не хребетних після першої лінії анатомо-фізіологічних засобів захисту. Вона включає гемопоетичні клітини – тучні клітини, макрофаги, дендритні клітини, нейтрофіли та еозинофіли, отримані з мієлоїдної лінії та природні клітини-кілери. Як показали дослідження останніх років, клітини вродженого імунітету можуть запам'ятовувати попередні зустрічі з інфекційними або неінфекційними подразниками [2]. Встановлено широке коло мікроорганізмів та компонентів мікробних клітин – потужних індукторів вродженої імунної пам'яті, котрі спричиняють епігенетичне перепрограмування уроджених імунних клітин (стійкі зміни в експресії генів і клітинної фізіології) і таким чином стимулюють імунологічну пам'ять, аналогічну тій, що спостерігається в набутому імунітеті [4]. Раніше це явище було відомо для нижчих організмів (включаючи безхребетних, рослин, бактерій та археїв), позбавлених адаптивного імунітету, але здатних підвищувати стійкість до

реінфекції [4-6]. Хоча існує думка, що імунологічна пам'ять є поступовим і багатовимірним явищем, непридатним до будь-якої простої дихотомії [5], в поточній науковій літературі для опису здатності організму виробляти загострену імунологічну відповідь для захисту від повторної інфекції, незалежну від адаптаційного імунітету використовується термін «тренований уроджений імунітет», запропонований Netea MG (2011) [7]. Ця імунологічна пам'ять може тривати від 1 тижня до кількох місяців і описана в уроджених імунних клітинах, таких як моноцити, макрофаги та природні NK клітини-вбивці. Парадоксально, але тривалість життя цих клітин у крові коротша за тривалість тренованого імунітету, що дозволяє припустити, що у тренованому імунітеті можуть бути задіяні клітини з більшою тривалістю життя, такі як стовбурові клітини та не імунні клітини, такі як фібробласти [2].

У відповідь на продукти мікроорганізмів інфільтраційні та міелоїдні клітини можуть адаптуватися до умов навколишнього середовища та набувати спеціалізованих функцій, включаючи фагоцитоз та продукцію прозапальних цитокінів. Така міелоїдна пластичність частково обумовлена епігенетичною динамікою, яка може підтримувати стабільні фенотипи після активації [8]. Вперше про це явище повідомлялося в дослідженнях впливу БЦЖ і β-глюкану на клітини вродженого імунітету, котрі через сигналізацію NOD2 (БЦЖ) та через дектин-1 індують епігенетичне перепрограмування, зокрема стабільні зміни триметилування гістону на H3K4. Ці епігенетичні зміни призводять до активації клітин, посилення вироблення цитокінів та зміни метаболічного стану клітини з переходом від окисного фосфорилування до аеробного гліколізу [6].

Роль фагоцитозу, найважливішої ранньої події мікробіцидної реакції нейтрофілів, зараз оцінено для функціонування багатьох функцій у різних типах клітин. Професійні фагоцити відіграють центральну роль у вродженому імунітеті, виводячи патогенні бактерії, грибки та злоскісні клітини, і сприяють адаптаційному імунітету, презентуючи антигени лімфоцитам. Функціональна універсальність нейтрофілів підтримується великим набором рецепторів, здатних розпізнавати вражаючу різноманітність чужорідних та ендогенних лігандів [9].

Концепція тренованого вродженого імунітету має значний потенціал для нових підходів до конструювання вакцин нових поколінь, які поєднують адаптивну та вроджену імунну пам'ять, нових терапевтичних стратегій лікування станів імунодефіциту та модуляції перебільшеного запалення при аутозапальних захворюваннях [4, 10].

Розглянута концепція стала підґрунтям для наших досліджень у напрямку конструювання ком-

бінованої дифтерійної вакцини нового класу, до складу якої нами запропоновано увести комплекс поверхневих антигенів, одержаних за допомогою дезінтеграції бактеріальної маси *C. diphtheriae* фізичними чинниками [11, 12]. Бактеріальний компонент має, по-перше, замінити собою нейротоксичний ад'ювант гідроксид алюмінію, з яким пов'язують також численні шкірні реакції у щеплених дифтерійними вакцинами [13, 14], по-друге, забезпечити антиколонізаційну дію щодо збудника дифтерії та попередження бактеріоносійства, оскільки дифтерійний анатоксин не попереджає колонізацію слизових збудником дифтерії [15], по-третє, через систему уродженого імунітету він може забезпечити ряд цінних гетерологічних ефектів, підсилюючих імунний захист [16-18].

Мета роботи. Показати можливі прояви «імунологічної пам'яті» нейтрофілів як популяції клітин системи уродженого імунітету при дослідженні динаміки активності фагоцитозу тест-об'єкту *C. diphtheriae* після повторних стимулів імунної системи піддослідних кролів експериментальним дифтерійним бактеріальним антигенним препаратом.

Матеріал та методи дослідження. Бактеріальний дифтерійний антиген одержували авторським способом [11]. В піддослідних кролів напередодні введення досліджуваного препарату асептично брали кров з вушної вени одноразовим шприцем та визначали активність фагоцитозу музейного тест-штаму *C. diphtheriae* var. *gravis*, *tox+*, прямим морфологічним методом [19]. На другий день підшкірно вводили 0,5 мл експериментального антигенного препарату та через 3 години знову брали кров для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів. Розраховували показники активності фагоцитозу: мікробне число (МЧ) – кількість бактерій у 100 нейтрофілах, індекс фагоцитозу (ІФ) – середню кількість фагоцитованих бактерій у 1 нейтрофілі, відсоток фагоцитуючих нейтрофілів (ФН), фагоцитарне число (ФЧ) – відношення МЧ до ФН. Надалі з інтервалом 1 місяць двічі проводили аналогічні дослідження та оцінювали одержані результати за допомогою статистичних методів з використанням програми Microsoft Excel [20].

Експериментальні дослідження проводили з дотриманням етичних норм (Directive 86/609/ЕЕС) положень Європейської конвенції про захист безребетних тварин, які використовуються для експериментів та наукових цілей (2005) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (2013).

Результати дослідження. Проведені дослідження показали, що експериментальний бактеріальний дифтерійний антигенний препарат стимулює

фагоцитарну активність нейтрофілів у кролячій крові при кожному введенні препарату. З даних, представлених на **рисунку 1**, очевидно, що вже після першого щеплення істотно виріс показник МЧ – у 2,8 разів (**рис. 1**).

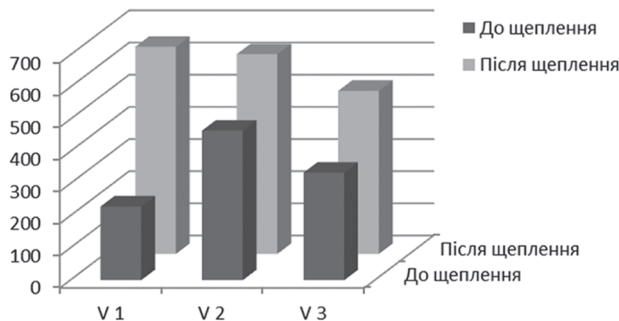


Рис. 1. Динаміка показників кількості фагоцитованих мікробних клітин *S. diphtheriae* (МЧ) при повторних щепленнях кролів експериментальним бактеріальним антигеном *S. diphtheriae*

Після другого щеплення різниця становила 1,3 рази, після третього – 1,5 рази, але стан фагоцитарної активності нейтрофілів напередодні введення антигенного препарату при другому та третьому щепленні був помітно підвищеним у порівнянні з вихідним значенням МЧ – у 2,0 та 1,5 рази, відповідно. Тобто повторна вакцинація забезпечує як підвищену готовність нейтрофілів до поглинання мікробних клітин, так і більший рівень їх реагування. Слід зазначити, що показники базисного темпу приросту з кожним введенням препарату, хоча були значними, але зменшувалися: максимальний рівень зареєстрований після першого щеплення – 181,2 %, після другого щеплення цей показник складав 171,2 %, після третього – 121,4 %. Динаміка інших показників фагоцитарної активності представлена у **таблиці 1**.

Таблиця 1 – Динаміка показників активності фагоцитозу у крові кроля при повторних щепленнях дифтерійним бактеріальним антигеном

№ № щеплення	Час дослідження	ІФ, (M±m)	ФН, (M±m)	ФЧ, (M±m)
Перше щеплення	До вакцинації	2,3±0,4	53±5,0	4,3±0,3
	Після вакцинації	6,4±0,4	78±4,1	8,3±0,3
Друге щеплення	До вакцинації	4,7±0,5	58±4,9	8,0±0,4
	Після вакцинації	6,2±0,5	67±4,7	9,3±0,4
Третє щеплення	До вакцинації	3,3±0,3	56±5,0	6,0±0,2
	Після вакцинації	5,1±0,4	64±4,8	7,9±0,3
У середньому	До вакцинації	3,4±0,4	56±5,0	6,1±0,3
	Після вакцинації	5,9±0,4	70±4,5	8,5±0,3

Статистичне обчислення результатів показало, що усі показники фагоцитарної активності нейтрофілів під впливом першого антигенного стимулу

істотно збільшилися, відповідно, у 2,8 рази (ІФ), у 1,5 рази (ФН) та у 2,0 рази (ФЧ) ($t > 2, p = 0,05$).

При повторному (через місяць) введенні дослідний бактеріальний дифтерійний антигенний препарат суттєво стимулював фагоцитарну активність нейтрофілів у порівнянні з вихідними рівнями фагоцитарної активності у першому досліді, а саме: ІФ виріс на 51,1%, ФН – на 26,4 %, ФЧ – на 46,3 % ($t > 2, p = 0,05$). Достовірної різниці поміж значеннями ІФ та ФН після першого та другого щеплення не було ($t < 2, p = 0,05$), проте рівень ФЧ виявився істотно вищим ($t = 2, p = 0,05$). Відносно показників, одержаних напередодні другого щеплення, ІФ виріс на 24,2 %, ФЧ – на 14 % ($t > 2, p = 0,05$). Збільшення ФН виявилось не достовірним ($t < 2, p = 0,05$).

Щодо впливу третього введення бактеріального антигенного препарату, результати були аналогічними, а саме: ІФ збільшився у 1,5 рази, ФЧ – у 1,3 рази у порівнянні з показниками активності фагоцитозу, визначеними напередодні ($t > 2, p = 0,05$). Відносно вихідного рівня до щеплення різниця становила, відповідно, 2,2 рази (ІФ) та 1,8 рази (ФЧ). Відсоток фагоцитуючих нейтрофілів після третього щеплення статистично не відрізнявся як від вихідного рівня, так і зареєстрованого значення при другому введенні досліджуваного препарату ($t < 2, p = 0,05$).

Обговорення отриманих результатів. Одержані результати свідчать про те, що збільшення кількості поглинутих нейтрофілами мікробних клітин при повторних щепленнях забезпечувалося не збільшенням кількості фагоцитуючих нейтрофілів, а підвищенням їх ефективності. Інтерпретація результатів експерименту у рамках методології проведених досліджень не може дати відповіді про механізми, які обумовили підвищення ефективності нейтрофілів. Чи йдеться про епігенетичне перепрограмування ізольованих клітин уродженого імунітету або про вплив інших клітин системи уродженого захисту, насамперед макрофагів, або про інші механізми регуляції залишається поки що неясним.

У наукових публікаціях останніх декількох років обговорюється важливість зв'язку між клітинами вродженої імунної системи у визначенні як якості, так і величини імунної відповіді [21]. Все більша кількість досліджень свідчить про те, що перехресне спілкування між популяціями мієлоїдних клітин надає істотний внесок у започаткування імунної відповіді. Разом з ILC (*innate lymphoid cells*), мієлоїдні клітини відіграють центральну роль у пристосуванні імунної відповіді та пов'язаних з ними ефektorних клітинних функцій для різних груп збудників. Є думка, що кожна з клітин вродженої імунної системи програмується імунологічним середовищем для активації специфічних модулів сигнального

шляху, які опосередковують експресію різних молекул на поверхні клітин та секретованих молекул. Клітини вродженої імунної системи можуть забезпечити більш швидко спрямовану реакцію при повторних антигенних стимулах і тим самим сприяти набутій стійкості. Зараз це найкраще задокументовано для NK-клітин та макрофагів [6]. Це створює ймовірність того, що також будуть ідентифіковані інші клітини вродженої імунної системи з властивостями пам'яті. Ряд публікацій присвячений вивченню хіміотаксичної міграційної пам'яті нейтрофілів [22]. Представляють інтерес нещодавні дослідження про те, що менш спеціалізовані, ніж моноцити та дендритні клітини, свіжоізольовані нейтрофіли людини можуть функціонувати як антиген-презентуючі клітини пам'яті CD4 + Т-клітинами *in vitro* та *ex vivo* [23]. Показано також важливий механізм, за допомогою якого ад'юванти посилюють відповіді на вакцини, а саме: при імунізації макак-резусів відбувається сильна активація клітин вродженого захисту – нейтрофілів, моноцитів, мієлоїдних та плазматичарних дендритних клітин, їх міграція виключно до дренажних вузлів лімфатичних вузлів та значне поглинання ними флуоресцентно маркованого глікопротеїну оболонки ВІЛ-1 (Env) з досліджуваними ад'ювантами (квасці, попередньо адсорбовані на квасцях ліганди Toll-подібного рецептору 7 (alum-TLR7) або емульсія MF59), що сприяє ефективній доставці антигенного матеріалу вакцини CD4 + Т-клітинами [24].

Одержані в нашому експерименті дані не суперечать наведеним літературним даним та сучасній

концепції про навчений вроджений імунітет [3], але потребують подальших досліджень. Центральний принцип вродженої набутої резистентності полягає в тому, що специфіка реакції пам'яті залежить від активації специфічних PRR (*Pattern recognition receptors*), аналогічних активації Т-клітин і В-клітин через антигенні рецептори. Відповіді на запитання, що стосуються зв'язку між клітинами вродженої імунної системи, можуть дати фундаментальну інформацію про те, як збудити вроджену імунну відповідь терапевтично, орієнтуючись на конкретні сигнальні шляхи, які можуть підвищити опір та / або запобігти шкідливим запальним реакціям, поставити нові цілі щодо розвитку більш ефективних вакцин нових поколінь.

Висновок. Дослідний бактеріальний дифтерійний антигенний препарат стимулював фагоцитарну активність нейтрофілів у кролячій крові після першого, другого і третього щеплення. Збільшення показників фагоцитозу як попередні повторних щеплень, так і після них може свідчити про збереження інформації клітинами системи уродженого імунітету про антигенний стимул, одержаний при першому введенні досліджуваного препарату.

Перспективи подальших досліджень. Одержані результати є перспективними для конструювання комбінованої дифтерійної вакцини з бактеріальним компонентом, спрямованої на попередження колонізації збудником слизових оболонок респіраторного тракту і токсичних форм дифтерії, а також для подальшого вивчення механізмів уродженої імунної пам'яті.

References

1. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten L. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe*. 2019 Jan 9; 25(1): 13-26. PMID: 30629914. doi: 10.1016/j.chom.2018.12.006
2. Hamada A, Torre C, Drancourt M, Ghigo E. Trained Immunity Carried by Non-immune Cells. *Front Microbiol*. 14 Jan 2019. PMID: 30692968. PMCID: PMC6340064. doi: 10.3389/fmicb.2018.03225
3. Yelyseieva IV, Babych YeM, Zhdamarova LA, Bilozerskyi VI, Kolpak SA. Navcheni urodzheni imunitet yak osnova novykh stratehii u rozrobtci vaktzyn. *Ukrainskyi zhurnal medytsyny, biologii ta sportu*. 2019; 4(21): 8-16. [Ukrainian] doi: 10.26693/jmbs04.05.009
4. Rusek P, Wala M, Druszczynska M, Fol M. Infectious Agents as Stimuli of Trained Innate Immunity. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 3; 19(2). pii: E456. PMID: 29401667. PMCID: PMC5855678. doi: 10.3390/ijms19020456
5. Pradeu T, Du Pasquier L. Immunological memory: What's in a name? *Immunol Rev*. 2018 May; 283(1): 7-20. PMID: 29664563. doi: 10.1111/imr.12652
6. van der Meer JW, Joosten LA, Riksen N, Netea MG. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Mol Immunol*. 2015 Nov; 68(1): 40-4. PMID: 26597205. doi: 10.1016/j.molimm.2015.06.019
7. Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*. 2011 May 19; 9(5): 355-61. PMID: 21575907. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.006
8. Rodriguez RM, Suarez-Alvarez B, Lopez-Larrea C. Therapeutic Epigenetic Reprogramming of Trained Immunity in Myeloid Cells. *Trends Immunol*. 2019 Jan; 40(1): 66-80. PMID: 30595189. doi: 10.1016/j.it.2018.11.006
9. Lim JJ, Grinstein S, Roth Z. Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 May 23; 7: 191. PMID: 28589095. PMCID: PMC5440456. doi: 10.3389/fcimb.2017.00191
10. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016 Apr 22; 352(6284): aaf1098. PMID: 27102489. PMCID: PMC5087274. doi: 10.1126/science.aaf1098

11. *Patent 86891 Ukraine*. Sposib otrimannya bakterijnogo differijnogo antigenu. № U2013097794; zayavl. 06.08.2013; opubl. 10.01.2014, Byul. № 1. 4 s. [Ukrainian]
12. Yeliseyeva IV, Babich YeM, Zhdamarova LA, Byelozerskij VI, Kolpak SA. Poverhnevi antigeni zbudnika differiyi, oderzhani za dopomogoyu fizichnih chinnikov, yak biologichna platforma dlya rozrobki kombinovanoyi differijnoyi kandidat-vakcini. *Visnik problem biologiyi i medicini*. 2018; 3(145): 251–6. [Ukrainian]
13. Shaw CA, Li D, Tomljenovic L. Are there negative CNS impacts of aluminum adjuvants used in vaccines and immunotherapy? *Immunotherapy*. 2014; 6(10): 1055–71. PMID: 25428645. doi.org/10.2217/imt.14.81
14. Braginskaya VP, Sokolova AF. *Aktivnaya immunizaciya detej*. Monografiya. M: Medicina; 1990. 203 s. [Russian]
15. Yelyseyeva I, Babych Eu, Kivva F. *New approaches to development of diphtheria vaccine. Anti-colonization strategy for the development of a combined diphtheria vaccine with bacterial antigen component*. Publishing House: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2018.
16. Crisan TO, Netea MG, Joosten LA. Innate immune memory: implications for host responses to damage-associated molecular patterns. *Eur J Immunol*. 2016 Apr; 46(4): 817–28. PMID: 26970440. doi: 10.1002/eji.201545497
17. Cauchi S, Loch C. Non-specific Effects of Live Attenuated Pertussis Vaccine Against Heterologous Infectious and Inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2018 Dec 7; 9: 2872. PMID: 30581436. PMCID: PMC6292865. doi: 10.3389/fimmu.2018.02872
18. Uthayakumar D, Paris S, Chapat L, Freyburger L, Poulet H, De Luca K. Non-specific Effects of Vaccines Illustrated Through the BCG Example: From Observations to Demonstrations. *Front Immunol*. 2018 Dec 4. PMID: 30564249. PMCID: PMC6288394. doi: 10.3389/fimmu.2018.02869
19. Labinskaya AS. *Mikrobiologiya s tehnikoj mikrobiologicheskikh issledovanij* [4-e izd, pererab i dop]. M: Medicina; 1978. 391 s. [Russian]
20. Zajczew VM, Lifyandskij VG, Marinkin VI. *Prikladnaya mediczinskaya statistika*. Uchebnoe posobie. SPb: OOO «Izdatel'stvo Foliant»; 2003. 432 s. [Russian]
21. Rivera A, Siracusa MC, Yap GS, Gause WC. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. *Nat Immunol*. 2016 Apr; 17(4): 356–63. PMID: 27002843. PMCID: PMC4949486. doi: 10.1038/ni.3375
22. Yang K, Wu J, Xu G, Xie D, Peretz-Soroka H, Santos S, et al. A dual-docking microfluidic cell migration assay (D2-Chip) for testing neutrophil chemotaxis and the memory effect. *Integr Biol (Camb)*. 2017 Apr 18; 9(4): 303–12. PMID: 28367571. PMCID: PMC5511521. doi: 10.1039/c7ib00037e
23. Vono M, Lin A, Norrby-Teglund A, Koup RA, Liang F, Loré K. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4+ T cells in vitro and ex vivo. *Blood*. 2017 Apr 6; 129(14): 1991–2001. PMID: 28143882. PMCID: PMC5383872. doi: 10.1182/blood-2016-10-744441
24. Liang F, Lindgren G, Sandgren KJ, Thompson EA, Francica JR, Seubert A, et al. Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes and controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. *Sci Transl Med*. 2017 Jun 7; 9(393): pii: eaal2094. PMID: 28592561. doi: 10.1126/scitranslmed.aal2094

УДК 579.871.1:612.017.12:57.083.3:612.112.3

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПОСЛЕ ПОВТОРНОЙ ВАКЦИНАЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИФТЕРИЙНЫМ БАКТЕРИАЛЬНЫМ АНТИГЕННЫМ ПРЕПАРАТОМ

Елизеева И. В., Ждамарова Л. А., Белозерский В. И., Колпак С. А., Балак А. К.

Резюме. Целью работы было показать возможные проявления «иммунологической памяти» нейтрофилов как популяции клеток системы врожденного иммунитета при исследовании динамики активности фагоцитоза тест-объекта *C. diphtheriae var. gravis, tox+* после повторных стимулов иммунной системы подопытных кролей экспериментальным дифтерийным бактериальным антигенным препаратом. Препарат получали авторским способом. Фагоцитарную активность нейтрофилов в кроличьей крови исследовали прямым морфологическим методом накануне введения исследуемого препарата и на другой день, через 3 часа после каждой иммунизации. Исследуемый дифтерийный бактериальный антигенный препарат существенно стимулировал фагоцитарную активность нейтрофилов после первой, второй и третьей вакцинации. Средние значения показателей активности фагоцитоза после всех трех антигенных стимулов были достоверно выше, чем их средние уровни накануне вакцинации ($t > 2$, $p = 0,05$). Увеличение количества поглощенных микробных клеток при повторных вакцинациях обеспечивалось не увеличением количества фагоцитирующих нейтрофилов, а повышением их эффективности. Повторная вакцинация обеспечивала как повышенную готовность нейтрофилов к поглощению микробных клеток, так и больший уровень их реагирования. Полученные результаты эксперимента можно объяснить с позиций концепции обученного врожденного иммунитета и эпигенетического программирования клеток врожденного иммунитета. Увеличение показателей фагоцитоза накануне повторных антигенных стимулов и после них может свидетельствовать о сохранении информации клетками системы врожденного иммунитета об

антигенном стимуле, полученном при первом введении исследуемого препарата. Полученные результаты являются перспективными для конструирования комбинированной дифтерийной вакцины с бактериальным компонентом, направленной на предупреждение колонизации возбудителем слизистых оболочек респираторного тракта и токсических форм дифтерии.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, нейтрофилы, фагоцитоз, дифтерийный бактериальный антиген, дифтерийная вакцина.

UDC 579.871.1:612.017.12:57.083.3:612.112.3

Dynamics of Neutrophils Phagocitary Activity after Repeated Vaccinations of Laboratory Animals by Experimental Diphtheriae Bacterial Antigen Drug

Yelyseyeva I., Zhdamarova L., Belozerskii V., Kolpak S., Balak O.

Abstract. *The purpose of the work was to show possible manifestations of the "immunological memory" of neutrophils as a population of cells of the innate immunity system when studying the dynamics of phagocytosis activity of the test object *C. diphtheriae var. gravis, tox +* after repeated stimuli of the immune system of experimental rabbits by experimental diphtheria bacterial antigen drug. The drug was obtained by the authors' method.*

Material and methods. The phagocytic activity of neutrophils in rabbit blood was examined by direct morphological method before administration of the test drug and on the second day, 3 hours after each vaccination. The activity indices of phagocytosis were calculated: microbial number, phagocytosis index, percentage of phagocytic neutrophils, and phagocytic number. Subsequently, at intervals of 1 month, similar studies were performed twice and the results obtained were evaluated using conventional statistical methods ($p=0.05$).

Results and discussion. Studies showed that microbial number was significantly higher than its baseline 2.0 and 1.5 times, respectively. It should be noted that the indicators of the baseline rate of increase of microbial numbers with each administration of the drug, although they were significant, but decreased: the maximum value of this index was registered after the first vaccination – 180 %, after the second vaccination it was slightly lower – 170 %, after the third dropped to 120 %. Statistical processing of the results showed that all other indices of phagocytic activity of neutrophils under the influence of the first antigenic stimulus increased significantly by 2.8 times (phagocytosis index), by 1.5 times (phagocytic number), and by 2.0 times (phagocytic neutrophils) ($t > 2$, $p = 0.05$).

When re-vaccinated compared with baseline levels of phagocytic activity in the first experiment, phagocytosis index increased by 51 %, phagocytic neutrophils – by 26 %, phagocytic number – by 46 % ($t > 2$, $p = 0.05$). There was no authentic difference between phagocytosis index and phagocytic neutrophils values after the first and second vaccinations ($t < 2$, $p = 0.05$), but the level of phagocytic number was significantly higher ($t = 2$, $p = 0.05$). In relation to the indices obtained on the eve of the second vaccination, the phagocytosis index increased by 24 %, the phagocytic number – by 14% ($t > 2$, $p = 0.05$). The increase in phagocytic neutrophils was not significant ($t < 2$, $p = 0.05$). With regard to the influence of the third antigenic stimulus, the dynamics of phagocytosis activity indices was similar.

Their average values on the eve of all three vaccinations were much below than average levels after the vaccinations ($t > 2$, $p = 0.05$). The increase in the number of absorbed microbial cells in repeated vaccinations was provided not by increasing the number of phagocytic neutrophils, but by increasing their efficiency. The results of the experiment can be explained from the standpoint of the concept of trained innate immunity and epigenetic reprogramming of the innate immunity cells.

Conclusion. Experimental bacterial diphtheria antigen drug stimulated the phagocytic activity of neutrophils in rabbit blood after the first, second and third vaccinations. Re-vaccination provides both increased neutrophils readiness for microbial cell uptake and a greater level of response. An increase in phagocytosis indices on the eve of repeated vaccinations and after them can indicate that the cells of the system of innate immunity save the information about antigenic stimulus obtained at the first administration of the test drug. The obtained results are promising for the design of a combined diphtheria vaccine with a bacterial component aimed at preventing colonization by the pathogen of the respiratory tract mucosa and toxic forms of diphtheria.

Keywords: innate immunity, neutrophils, phagocytosis, diphtheria bacterial antigen, diphtheria vaccine.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 26.07.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування