

УДК 579.871.1:57.083.3:615.371.

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ПРЕПАРАТІВ СУБКЛІТИННИХ КОМПЛЕКСІВ ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ НА АКТИВНІСТЬ ФАГОЦИТОЗУ ПРИ ІМУНІЗАЦІЇ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

Слисєєва І.В., Бабич Є.М., Ждамарова Л.А., Колпак С.А., Ігумнова Н.І., Сидоренко Т.А., Бобирєва І.В.

ДУ «ІМІ мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України»

Загально визнаним є той факт, що макрофаги і нейтрофіли беруть участь у захисті організму за допомогою ідентичного багатоступеневого процесу в кооперації фагоцитів з іншими лейкоцитами [1]. Багато зі стимуляторів імунної відповіді здатні підсилювати і неспецифічну протиінфекційну резистентність. Це є поперед за все результатом підсилення бактерицидної активності фагоцитів. В наших дослідженнях ми вивчали взаємозв'язок між ад'ювантною дією досліджуваних антигенних препаратів субклітинних комплексів патогенних коринебактерій і здатністю фагоцитів кролячої крові поглинати бактеріальні клітини збудника дифтерії.

Окрім того, враховуючи, що існує прямий функціональний зв'язок поміж фагоцитарною системою і системою комплементу, яка забезпечує опсонізацію мікроорганізмів як необхідну умову фагоцитозу, в проведених нами дослідженнях були визначені і показники комплементу.

Матеріали і методи

Таблиця 1.- Динаміка рівня гуморального імунітету проти дифтерії (за даними РПГА) в сироватках крові кролів після їх парентеральної імунізації досліджуваними антигенними препаратами

№№ кролів	Склад вакцини	Рівень антитоксинів, МО/мл			
		7 днів	14 днів	21 день	28 днів
1	п/ш 0,4 мл ДЗ II 7 h (1:1000) + 1,0 мл АД (20 Lf)	0	0,5	16,0	16,0
2	п/ш 0,4 мл СН (1:2000) + 1,0 мл АД (20 Lf)	0	0,03	0	0,03
3	п/ш 0,4 мл кл. ст., сер.1 + 1,0 мл АД (20 Lf)	0	0	0	0
4	п/ш 0,4 мл кл. ст., сер.2 + 1,0 мл АД (20 Lf)	0	0,5	1,0	0,25
5	п/ш 1,0 мл ДЗ II 7 h (1:1000) + 0,4 мл гель $Al_2(OH)_3$	0	0	0	0
6	п/ш 1,0 мл СН (1:2000) + 0,4 мл гель $Al_2(OH)_3$	0	0,03	0	0
7	п/ш 1,0 мл кл. ст., сер.1 + 0,4 мл гель $Al_2(OH)_3$	0	0	0	0
8	п/ш 1,0 мл кл. ст., сер.2 + 0,4 мл гель $Al_2(OH)_3$	0	0,03	0	0,03
9	п/ш 0,4 мл ДЗ II 7 h (нерозв.) + 1,0 мл АД (20 Lf)	>256,0	>256,0	>256,0	>256,0
10	п/ш 0,4 мл СН (1:2) + 1,0 мл АД (20 Lf)	0,5	4,0	2,0	2,0

Скринінг крові кролів за фагоцитарною активністю нейтрофілів та моноцитів здійснювали відповідно до методики [2]. Здатність до фагоцитозу моноцитів вивчалася нами, враховуючи, що ця популяція лейкоцитів відіграє специфічну роль саме при захисті організму людини від різноманітних інфекційних захворювань (бактеріальної, вірусної, протозойної, грибкової, рикетсіозної етіології), а в хворих на тяжкі форми дифтерії серед інших змін у формулі крові (лейкопенія, еозінофілія, тромбocyтопенія) може спостерігатися моноцитоз [3].

За об'єкт фагоцитозу був взятий інактивований штам *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* токсигенний, massachusetts, одержаний з відходів дифтерійного виробництва ЗАТ «Біолік», у концентрації 10^9 КУО/мл.

Фагоцитарну реакцію оцінювали за допомогою наступних показників: активності фагоцитозу або відсотку фагоцитарно-активних нейтрофілів (КФ), індексу фагоцитозу (ІФ) – середньої кількості поглинутих мікробів на один фагоцит, фагоцитарного числа (ФЧ) – середньої кількості мікробів в один фагоцит. Також визначали показники пошкодження нейтрофілів (ППН) досліджуваними речовинами [2]. Одержані дані обчислювали методом варіаційної статистики. Аналіз одержаних експериментальних даних проводився у середніх показниках на групу піддослідних тварин.

Досліди було проведено наступним чином: в зразках крові 13 кролів досліджувалась здатність нейтрофілів та моноцитів до фагоцитозу, потім тварин було вакциновано парентерально експериментальними зразками дифтерійних антигенних препаратів (таблиця 1) [4, 5].

11	п/ш 1,0 мл ДЗ II 7 h (нерозв.)	0,125	0,06	16,0	0,03
12	п/ш 1,0 мл кл. ст., сер.1	0	0,03	0	0
13	п/ш 1,0 мл кл. ст., сер.2	0	0,03	0	0

Через місяць після первинного щеплення кров у тварин взяли повторно і знову визначили відповідні показники [2].

Результати та обговорення

За період поміж забором зразків крові, як видно з даних таблиці 2, співвідношення лімфоцитів, моноцитів і нейтрофілів у кролів не змінилося ($t < 2$); лімфоцити залишилися домінуючою популяцією лейкоцитів. Відсоток лімфоцитів і нейтрофілів в середньому відповідав нормальним показникам [6]. Відсутність еозинофілів та базофілів теж є припустимим у нормі фактом.

Вивчення фагоцитарної реакції лейкоцитів свідчить про специфічну реакцію кожної з популяцій фагоцитів (таблиця 3).

Таблиця 2.- Відсоткове співвідношення клітин крові у кролів до та після парентерального щеплення антигенними препаратами субклітинних комплексів збудника дифтерії

Клітини крові	Питома вага лейкоцитів, (M ± m), %	
	до вакцинації	після вакцинації
Лімфоцити	(68,7 ± 1,8)	(69,9 ± 1,4)
Еозинофіли, базофіли	0	0
Моноцити	(13,6 ± 1,3)	(12,5 ± 1,0)
Нейтрофіли	(17,7 ± 1,5)	(17,6 ± 1,2)

Таблиця 3.- Результати вивчення фагоцитарної реакції нейтрофілів і моноцитів крові кролів до та після імунізації досліджуваними антигенними препаратами субклітинних комплексів збудника дифтерії

Етапи дослідів	Клітини крові	Коефіцієнт фагоцитозу, (M ± m), %	Індекс фагоцитозу, (ІФ)	Фагоцитар-не число, (ФЧ)
До вакцинації	Моноцити	(42,7 ± 3,4)	1,6	3,8
	Нейтрофіли	(60,1 ± 1,7)	2,3	3,9
Після вакцинації	Моноцити	(29,1 ± 5,1)	0,6	1,4
	Нейтрофіли	(60,9 ± 2,9)	2,8	4,6

В нейтрофілів активність фагоцитозу (КФ) через місяць після щеплення не змінилася і складала близько 61 %, ІФ виріс з 2,3 до 2,8, а ФЧ – з 3,9 до 4,6. Стосовно моноцитів ситуація виглядає дещо по-іншому: у 1,5 рази зменшився КФ – з (42,7 ± 3,4) % до (29,1 ± 5,1) %. Окрім того, зменшилися ІФ та ФЧ моноцитів: обидва показники у 2,7 рази.

Таблиця 4. Показники пошкоджених лейкоцитів до та після імунізації досліджуваними антигенними препаратами

Клітини крові	до вакцинації,	після вакцинації,
Нейтрофіли	(19,5 ± 1,4)	(36,7 ± 2,9)
Моноцити	(28,1 ± 1,5)	(11,4 ± 3,6)

Одержані дані узгоджуються з гіпотезою про антимакрофагову активність багатьох ад'ювантів як причиною їх стимулюючої дії на імунну відповідь [7]. Згідно з цією гіпотезою багато з імуномодуляторів, в тому числі й мікробного походження (жива вакцина БЦЖ, коклюшна вакцина, *Mycobacterium butyricum*, *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium parvum*), введені без антигену, здатні підвищувати неспецифічну протинфекційну

Значно – майже в 2 рази – зросла питома вага пошкоджених нейтрофілів: з (19,5 ± 1,4) % до (36,7 ± 2,9) % (табл. 4). Щодо моноцитів, то в цій клітинній популяції відсоток пошкоджених клітин зменшився в 2,5 рази – з (28,1 ± 1,5) % до (11,4 ± 3,6) %.

резистентність організму. В той же час коли їх поєднують з антигеном з метою стимулювати гуморальну імунну відповідь, життєздатність і активність макрофагів зменшуються. Встановлено правило, що саме одночасне застосування антигену і ад'юванту забезпечує найкращі умови для підсилення антитілоутворення [7].

Непрямым аргументом на користь припущення про взаємозв'язок антимакрофагової та сти-

мулюючої імунну відповідь активність деяких імуномодуляторів можуть слугувати миші Biozzi, селекціоновані за здатністю до сильного антитілоутворення до бактеріальних антигенів і, відповідно, до слабкої імунної відповіді. Отже, макрофаги в перших розщеплюють антигени повільніше, ніж макрофаги в мишей зі слабким антитілоутворенням. Зворотно залежність між швидкістю розщеплення антигену і імунною відповіддю пояснюють здатністю ад'ювантів сповільнювати розщеплення антигенних молекул і тим самим забезпечувати найбільш тривале і, відповідно, ефективне представлення антигенних детермінант циркулюючим імунокомпетентним клітинам. Це може бути досягнуто шляхом зменшення числа присутніх як на місці введення антигену макрофагів (через їх вибіркове руйнування), так і їх супресії в різних тканинах усього організму. Можуть існувати й інші механізми (наприклад, зниження активності лізосомальних ферментів, уповільнення злиття фагосом з лізосомами і ін.). В результаті чужі антигенні детермінанти зберігаються на більш тривалий період,

що приводить до індукування сильної імунної відповіді.

В наших дослідженнях з 13 вакцинованих кролів той чи інший рівень протидифтерійних антиоксинів після щеплення був зареєстрований в 10 тварин, з яких половина одержувала комбінацію АД з різними ад'ювантами, виготовленими з мікробної маси збудника дифтерії (таблиця 1). При цьому в кролів №№ 1, 2, 4, 10 середній рівень протидифтерійних антиоксинів (2,8 МО/мл) в 3,5 рази перевищив цей показник в тварин №№ 6, 8, 11, 12, 13, які одержували лише ад'ювантні препарати (0,8 МО/мл).

Дослідження комплементу в піддослідних кролів після проведених щеплень показало суттєво варіюючі результати (таблиця 5). В тварин №№ 2, 3, 4, 6, 12, щеплених як комбінованими (№№ 2,3,4) так і монопрепаратами (№№ 6, 12) показники комплементу виявилися істотно зниженими у порівнянні з нормою (0,9-1,2 МО/мл), що зазвичай пояснюється зниженням природної резистентності організму кролів.

Таблиця 5.- Показники комплементу в кролів після щеплення досліджуваними антигенними препаратами збудника дифтерії

№№	оптична щільність	CH ₅₀	№№	оптична щільність	CH ₅₀	№№	оптична щільність	CH ₅₀
1	0,9	73,7	6	0,52	42,6	11	0,75	61,4
2	0,7	57,5	7	1,1	90,1	12	0,22	18,0
3	0,25	20,9	8	0,85	69,6	13	0,9	73,7
4	0,43	35,2	9	1,2	98,3	В середньому, (M ± m)	(0,76 ± 0,1)	(61,9 ± 8,1)
5	1,0	81,9	10	1,0	81,9			

Висновки

Проведені дослідження взаємозв'язку між ад'ювантною дією експериментальних антигенних препаратів субклітинних комплексів патогенних коринебактерій і здатністю фагоцитів кролячої крові поглинати бактеріальні клітини збудника дифтерії показали, що через місяць після імунізації зразками антигенних препаратів питома вага субпопуляції лейкоцитів у крові тварин не змінилася ($t < 2$), у нейтрофілів підвищився індекс фагоцитозу та фагоцитарне число, а в моноцитів всі показники фагоцитозу зменшилися, що взагалі може свідчити про стимулюючу дію експериментальних антигенних препаратів на імунну систему. Аналогічну тенденцію мали показники пошкоджених клітин: якщо в нейтрофілів він виріс у 2 рази, то в моноцитів у 2,5 рази зменшився. Показники комплементу після проведених щеплень дали істотно різні значення: майже половина тварин мала знижені рівні комплементу.

Список літератури

1. Плеханов Н. Г. Бактерицидная активность фагоцитов [Текст] / Н. Г. Плеханов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – М. : Медицина, 2006. – № 6. – С.89-96.

2. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований [Текст] / А. С. Лабинская // [4-е изд. перераб. и дополн.]. – М.: Медицина, 1978. – 391, [1] с. – Тираж 50 000.
3. Ривкин В. Л. Медицинский толковый словарь [Электронный ресурс] / В. Л. Ривкин // [М. : Медпрактика-М, 1998]. – 208 с.– Тираж 10000. – ISBN 5-901011-03-1. – Режим доступа до словн.: <http://www.medslova.ru/links/aaa.html>
4. Біологічна характеристика антигенів збудника дифтерії, виділених за допомогою фізико-хімічних методів / І.В.Слисєєва, С.М.Бабич, Л.А.Ждмарова, В.І.Білозерський, Т.В.Горбач, С.А.Колпак, І.В.Бобирєва // Аналі Мечніковського інституту.- 2008.- №№ 3.- С.25-31.
5. Антигенні та ад'ювантні властивості експериментальних зразків препаратів субклітинних комплексів збудника дифтерії при щепленні лабораторних тварин / І.В.Слисєєва, С.М.Бабич, Л.А.- Ждмарова, В.І.Білозерський, Т.В.Горбач, С.А.Колпак, І.В.Бобирєва // Аналі Мечніковського інституту.- 2009.- №№ 2.- С. 58-66.
6. Коробков А.В. Атлас по нормальной физиологии [Атлас] / А. В. Коробков, С. А. Чеснокова; под ред. Н.А. Агаджаняна. – М. : Высшая школа, 1990. – 351 с. – Тираж 75 000 экз.

7. Василев Ч. Л. Адьюванты иммунного ответа и макрофаги [Текст] / Ч. Л. Василев // Академия наук СССР. Успехи современной биологии. – М. : Наука, 1986. – Т. 101, вып. 3. – С. 430-435. – Тираж 2237. – ISSN 0042-1324.

УДК 579.871.1:57.083.3:615.371.

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ПРЕПАРАТІВ СУБКЛІТИННИХ КОМПЛЕКСІВ ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ НА АКТИВНІСТЬ ФАГОЦИТОЗУ ПРИ ІМУНІЗАЦІЇ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

Єлисеєва І.В., Бабич Є.М., Ждамарова Л.А., Колпак С.А., Ігумнова Н.І., Сидоренко Т.А., Бобирєва І.В.

Дослідження присвячені вивченню взаємозв'язку між ад'ювантною дією досліджуваних антигенних препаратів субклітинних комплексів патогенних коринебактерій і здатністю фагоцитів кролячої крові поглинати бактеріальні клітини збудника дифтерії. Встановлено, що через місяць після імунізації експериментальними зразками антигенних препаратів в нейтрофілів підвищився індекс фагоцитозу та фагоцитарне число, при цьому в моноцитах всі показники фагоцитарної активності зменшилися.

Ключові слова: дифтерія, імунізація, фагоцитоз, ад'юванти.

УДК 579.871.1:57.083.3:615.371

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ПРЕПАРАТОВ СУБКЛЕТОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ НА АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОЗА ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Єлисеєва І.В., Бабич Є.М., Ждамарова Л.А., Колпак С.А., Ігумнова Н.І., Сидоренко Т.А., Бобырєва І.В.

Исследования посвящены определению взаимосвязи между адьювантным действием исследуемых антигенных препаратов субклеточных комплексов патогенных коринебактерий и способностью фагоцитов кроличьей крови поглощать бактериальные клетки возбудителя дифтерии. Установлено, что через месяц после иммунизации экспериментальными образцами антигенных препаратов в нейтрофилах повысились индекс фагоцитоза и фагоцитарное число, при этом в моноцитах все показатели фагоцитарной активности снизились.

Ключевые слова: дифтерія, імунізація, фагоцитоз, адьюванты.

UDK 579.871.1:57.083.3:615.371.

STUDY OF EFFECT OF EXPERIMENTAL SAMPLES OF DIPHTHERIA PATHOGEN SUBCELLULAR COMPLEXES PREPARATIONS ON PHAGOCYTOSES DURING LABORATORY ANIMALS IMMUNIZATIONS

Yelyseyeva I.V., Babych Ye.M., Zhdamarova L.A.,

Kolpak S.A., Igumnova N.I., Sidorenko T.A., Bobireva I.V.

Study is dealt with evaluation of interrelationship between adjuvant effect of examining antigenic preparations of subcellular complexes pathogenic corynebacterium and phagocyte ability to consume diphtheria pathogen cells. Month later after immunization by experimental samples of antigenic preparations index of phagocytosis and phagocytic number have increased meanwhile all values of monocyte phagocytic activity have decreased.

Keywords: diphtheria, immunization, phagocytosis, adjuvants.