

О. М. Клімова^{1,2}, д.б.н., професор
А. І. Божков², д.б.н., професор
С. В. Сушков¹, д.мед.н., професор
О. В. Лавінська^{1,2}, к.б.н., старший науковий співробітник
К. О. Биченко^{1,2}, молодший науковий співробітник, аспірант
А. М. Агаркова¹, молодший науковий співробітник
В. І. Ворфоломєєва¹, лаборант
Н. І. Кургузова², викладач

¹ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМНУ»,
діагностична лабораторія з імуноферментним та імунофлуоресцентним
аналізом. м. Харків, в'їзд Балакірева, 1, Україна, 61103,
e-mail: elena.lavinskaya@ukr.net, 050 166 71 41

²Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, кафедра
молекулярної біології та біотехнології, пл. Свободи, 4, м. Харків, 61000,
Україна

ІМУНОФІЗІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ МІАСТОГЕННИХ СИРОВАТОК З РІЗНИМ СТУПЕНЕМ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ

Після імунізації тварин міастогенними сироватками різного ступеня цитотоксичності виявили сенсibiliзацію деяких показників вродженого імунітету – активності кисеньнезалежного і кисеньзалежного фагоцитозу, концентрації С3 і С4 компонентів комплементу.

Ключові слова: імунізація; міастогенна сироватка; цитотоксичність; фагоцитоз; комплемент.

У відповідь на введення антигенів в організмі відбувається його сенсibiliзація та імунна перебудова, що виявляється накопиченням або специфічним ослабленням і інгібуванням імунної відповіді. Антигени здатні взаємодіяти з лімфоцитами і антитілами, а при потраплянні в організм запускають процеси імуногенезу або викликають стан імунологічної толерантності [2, 8]. Вплив різних цитотоксичних чинників, що містяться в сироватці крові, призводить до зміни ключових подій у розвитку імуногенності – процесингу та презентації антигену, які здійснюються фагоцитуючими антигенпрезентуючими клітинами (нейтрофілами, дендритними клітинами, макрофагами і В-клітинами). Презентація антигену генерує антигенні пептиди, пов'язані з молекулами МНС (major histocompatibility complex) для передачі адаптивним імунним клітинам. В процесингу та презентації антигену головна роль притаманна фагоцитуючим клітинам та опсонізуючим чинникам системи комплементу [11, 16].

Механізми імуногенності можуть бути опосередковані різними чинниками, такими, як відмінності у молекулярній структурі або амінокислотній послідовності антигенів; агрегація білків (за рахунок наявності епітопів або змін у структурній конформації окремої молекули агрегованого білка); деградація білків (окиснення, дезамінування, глікозилювання); дія ад'ювантів [8, 17]. Присутність антигенних епітопів у агрегатах може безпосередньо стимулювати В-клітини і посилювати їх поглинання антигенпрезентуючими клітинами за рахунок порушення імунної толерантності [9, 10].

Процеси антигенного сприйняття у відповідь на чужорідні інфекційні та ендогенні антигени забезпечуються низкою рецепторів, таких як Fc-рецептори імуноглобулінів, рецептори білків комплементу, TLR, які є центральним елементом багаторівневої системи розпізнавання патоген-асоційованих молекулярних структур (РАМР), білки сімейства лектинів С-типу (манозозв'язуючий білок), суперродина імуноглобулінів і рецепторів білків теплового шоку [3, 7].

При розвитку запальної реакції збільшується ймовірність розвитку і посилення сенсibilізації. Здатність антигенів різної специфічності викликати імунну відповідь визначається ступенем імуногенності антигенів, яка залежить від трьох груп факторів: молекулярних особливостей антигену, кінетики антигену в організмі і реактивності макроорганізму [2]. Для дослідження імуногенності антигенних комплексів тваринні моделі становлять інтерес з огляду на практично однозначні прояви імунної відповіді. При імунізації в сироватці крові з'являється широкий спектр антитіл з різною афінністю – утворюються поліклональні антитіла, так як антиген стимулює велику кількість клонів В-клітин. Спосіб введення і доза антигенів впливає на розвиток сенсibilізації, тож рівень і афінність антитіл можна підвищити, варіюючи дозу антигенів, і забезпечуючи більшу кількість контактів з антигенами шляхом багаторазової імунізації [16]. Так, підшкірний шлях викликає імуногенну відповідь частіше, ніж інші шляхи. Локалізація, тривала присутність, підвищена концентрація і близькість до антигенпрезентуючих клітин при доставці антигену підшкірним шляхом можуть сприяти посиленому захопленню, обробці і презентації антигенів, що приводить до імуногенності [13]. Оцінка наявності та характеру запалення за впливу факторів імуногенної природи залишається важливою проблемою [18]. Запальний процес характеризується активацією імунних клітин, зміною проникності судин і синтезом прозапальних медіаторів, в тому числі цитокінів, хемокінів, ліпідних посередників, стероїдів, факторів росту і синтезом білків системи комплементу [4]. Активація локального імунітету у процесах кисень-незалежного і кисеньзалежного фагоцитозу і запалення сприяє сенсibilізації організму до речовин білкової природи [8, 12].

У хворих на міастенію, що представляє собою важкий нервово-м'язовий розлад, стресові тригерні фактори призводять до порушень на всіх рівнях регуляції, що сприяє утворенню міастогенних факторів, гетерогенна природа яких залишається невідомою. Викликає інтерес оцінка характеру впливу міастоген-

них факторів сироватки крові хворих з тимуснезалежною та тимусзалежною міастенією на ланки імунної системи. Для отримання інформації про ступінь імуногенності різних антигенів (в тому числі міастогенних сироваток) і про можливі наслідки механізмів сенсibilізації, необхідним є проведення досліджень з їх *in vivo* метаболізації.

Мета роботи – оцінити імунофізіологічні ефекти після імунізації тварин міастогенними сироватками з різним ступенем цитотоксичності, отриманих від хворих з тимуснезалежною та тимусзалежною міастенією.

Матеріали та методи досліджень

Експерименти проводили на 3-місячних щурах-самцях лінії Вістар масою 190–220 г. Тварини містилися в умовах стандартного світлового та харчового режиму (вода та їжа *ad libitum*). Дослідження проводили відповідно до положення Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.).

Для імунізації були відібрані сироватки пацієнтів з тимуснезалежною (М – міастенія, що протікає без морфо-функціональних змін тимусу) і тимусзалежною міастенією (МГ – міастенія на тлі гіперплазії тимусу; МТ – міастенія на тлі тимоми). Ступінь цитотоксичності відібраних сироваток встановлювали попередньо шляхом їх аналізу з використанням біоіндикатору *Dunaliella viridis* Teod. за коефіцієнтом цитотоксичності Кц [1]. Було прийнято Кц = 5,0 – низький ступінь цитотоксичності (М), Кц = 7,0 – середній ступінь цитотоксичності (МГ), Кц = 9,0 – високий ступінь цитотоксичності (МТ).

Індукцію сенсibilізації проводили шляхом 4-х-кратної (з інтервалом 72 години, об'ємом 0,1 мл) підшкірної імунізації в область очеревини тварин сироватками від хворих з різними клінічними фенотипами міастенії різного ступеня цитотоксичності. Були виділені 4 групи тварин (n = 5 в кожній групі): група I (контрольна) – тварини, яким вводили фізіологічний розчин об'ємом 0,1 мл; група II (М) – тварини, сенсibilізовані сироваткою з низьким ступенем цитотоксичності; група III (МГ) – тварини, сенсibilізовані сироваткою із середнім ступенем цитотоксичності; група IV (МТ) – тварини, сенсibilізовані сироваткою з високим ступенем цитотоксичності. Під час експерименту оцінювали фізіологічні показники тварин: температуру, рухову активність, зміну ваги, апетит, зміну функцій шлунково-кишкового тракту. Через 20 діб після першої імунізації тварин виводили з експерименту шляхом декапітації.

В роботі вивчали активність кисеньнезалежного (показники адгезії і ендцитозу нейтрофілів) [14] і кисеньзалежного фагоцитозу (тест відновлення нітросинього тетразолію у нерозчинний діформазан під впливом супероксид-аніону, що утворюється в НАДФ-Н-оксидазній реакції) [15] за допомогою світлової мікроскопії (Olympus BX53). Визначення концентрації С3 і С4 компонентів комплементу проводили за імунотурбідиметричним методом (Dialab, Австрія) на біохімічному аналізаторі Stat-Fax 1904 за довжини хвилі 340 нм [5].

Отримані результати аналізували за допомогою t-критерію Стьюдента. Використовували програму Statistica 6.0. Дані представляли у вигляді середнього і стандартної похибки середнього арифметичного (M+m).

Результати дослідження та їх обговорення

Антигенний вплив може чинити на організм як специфічну, так і неспецифічну дію. Перше пов'язане з якістю антигену, його здатністю викликати розвиток певних змін в організмі, і впливати на імунну систему за допомогою відповідних рецепторів для нього. Неспецифічна дія проявляється у впливі антигену як стресового чинника [4]. Опосередковано про активацію сенсibiliзації судили за зміною температури тварин. У перший час після введення різних антигенів виявляються однотипні зміни в організмі, які часто проявляються в зміні температури. У тварин контрольної групи температура становила в середньому $35,6 \pm 0,09$ °C. Після індукції сенсibiliзації сироватками з різним ступенем цитотоксичності у тварин було відзначено зміну температури – як реакцію на введення імуногенної сироватки (друга, п'ята, восьма та одинадцята доба експерименту на рис. 1). Після першої імунізації тварин відзначали підвищення температури на: $\Delta = 1,2$ °C в групі II (M), на $\Delta = 1,6$ °C в групах III

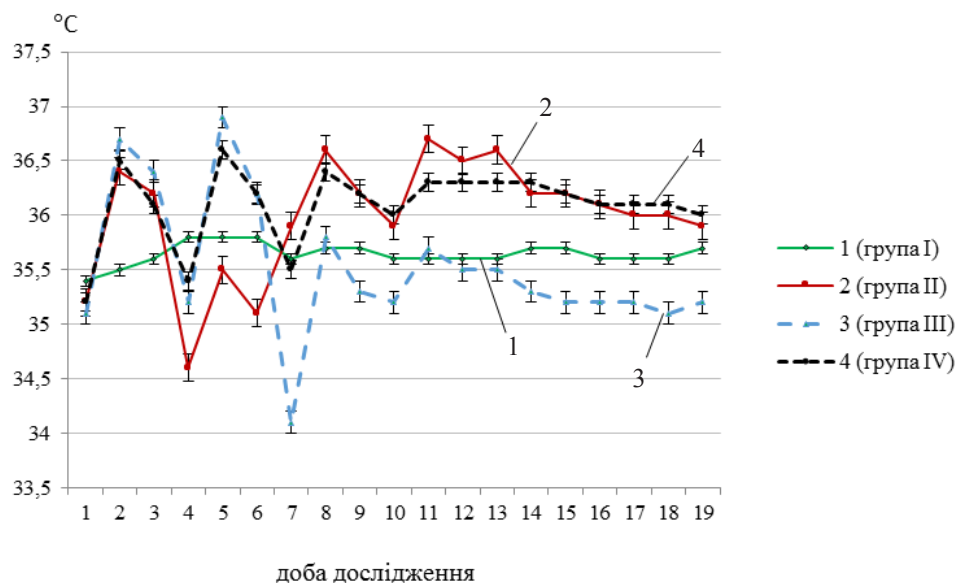


Рис. 1. Динаміка температури тіла у тварин в різні строки експерименту

Примітка: тварин імунізували на першу, четверту, сьому, десяту добу експерименту; група I – контроль; група II – тварини, імунізовані сироваткою з низькою цитотоксичністю (M); група III – тварини, імунізовані сироваткою з середньою цитотоксичністю (MG); група IV – тварини, імунізовані сироваткою з високою цитотоксичністю (MT); * – достовірність відмінності у порівнянні з дослідженням у першу добу експерименту, $p \leq 0,05$

(МГ) і IV (МТ). Після 4-ої імунізації зміна температури становила: $\Delta = 0,8$ °C в групі М, $\Delta = 0,5$ °C в групі МГ і $\Delta = 0,3$ °C в групі МТ. Температура тварин після антигенного навантаження становила в середньому: 35,8 °C – група МГ і 36,0 °C – група МТ.

Також у тварин після введення імуногенної сироватки спостерігали зниження апетиту, пригнічення функцій шлунково-кишкового тракту (діарея, запор, зміна консистенції калових мас), уповільнення приросту маси тіла. Мінімальний приріст маси тіла відзначали в групі тварин, імунізованих сироваткою з середнім ступенем цитотоксичності – група МГ, $\Delta = 15$ г (табл. 1).

Таблиця 1

Зміна маси тіла тварин в різні строки експерименту ($n = 5$)

Група	Доба / маса, г							Δ , г
	1	4	7	10	13	16	19	
I	198,0 ± 13,5	213,0 ± 9,5	229,7 ± 20,0	229,0 ± 10,5	236,3 ± 10,0	242,0 ± 15,7	251 ± 14,5	53
II	193,0 ± 12,4	217,5 ± 17,8	232,0 ± 21,8	234,5 ± 15,6	247,6 ± 27,8	254,5 ± 16,4	258,0 ± 13,8	65
III	187,0 ± 7,9	184,0 ± 20,8	192,5 ± 14,6	196,6 ± 14,1	201,0 ± 12,8	203,0 ± 12,1	202,0 ± 12,2	15
IV	186,0 ± 6,0	189,0 ± 4,9	195,0 ± 8,9	202,0 ± 15,5	208,5 ± 13,5	207,0 ± 11,8	218,0 ± 10,5	32

Примітка: група I – контроль; група II – тварини, імунізовані сироваткою з низькою цитотоксичністю (М); група III – тварини, імунізовані сироваткою з середньою цитотоксичністю (МГ); група IV – тварини, імунізовані сироваткою з високою цитотоксичністю (МТ); * – достовірність відмінності з контролем $p \leq 0,05$

Після проведення багаторазової імунізації тварин оцінювали вплив імуногенної міастогенної сироватки на чинники вродженого імунітету. Кисеньнезалежна фагоцитарна активність нейтрофілів відрізнялася зміною адгезивних властивостей. При дослідженні кількості клітин, що вступили в фагоцитоз (фагоцитарний індекс), не виявили достовірних відмінностей між контролем (група I) і тваринами, сенсibilізованими сироваткою з низькою цитотоксичністю (група II). Адгезивні властивості нейтрофілів були значно знижені у тварин, імунізованих сироваткою з середнім (група III) і високим (група IV) ступенем цитотоксичності. У групах тварин, сенсibilізованих сироваткою з високою та середньою цитотоксичністю спостерігали зниження фагоцитарного індексу в 1,5 і в 1,7 разів відповідно (табл. 2).

Фагоцитарне число, яке свідчить про середню кількість поглинутих антигенів, у II групі тварин, сенсibilізованих сироваткою з низьким ступенем цитотоксичності перевищувало даний показник у групах III і IV на 27 % та 34 % відповідно. У тварин, сенсibilізованих сироватками із середнім (група III) і високим (група IV) ступенем цитотоксичності також виявили зниження індек-

су завершеності фагоцитозу в середньому на 20 % в порівнянні з контрольною групою, що свідчить про недостатність перетравлюючої функції нейтрофілів (табл. 2).

Таблиця 2

Показники кисеньнезалежного та кисеньзалежного фагоцитозу у інтактних та імунізованих тварин ($n = 5$)

Показники		Група I	Група II	Група III	Група IV
Кисеньнезалежний фагоцитоз	ФІ, %	81,0±5,4	80,0±8,48	46,0±4,24*	53,0±7,07*
	ФЧ, у. од.	3,73±0,14	3,44±0,9	2,69±0,35*	2,57±1,06*
	ІЗФ, у. од.	1,45±0,18	1,71±0,13	1,19±0,05*	1,17±0,03*
Кисеньзалежний фагоцитоз	СП, %	24,0±1,3	58,0±2,4*	36,0±1,6*	43,0±2,5*
	СТ, %	74,0±6,9	65,0±3,9*	71,0±4,8	87,0±5,4*
	ІС, у. од.	3,08±0,3	1,12±0,21*	1,97±0,01*	2,02±0,03*

Примітка: ФІ – фагоцитарний індекс; ФЧ – фагоцитарне число; ІЗФ – індекс завершеності фагоцитозу; СП – кількість клітин, що поглинув барвник в спонтанній реакції; СТ – кількість клітин, що поглинув барвник в стимульованій зімозаном реакції; ІС – індекс стимуляції ($IC = ST/SP$); * – достовірність відмінності з контролем (група I) $p \leq 0,05$

Оцінку активності кисеньзалежного фагоцитозу проводили за окисно-відновною здатністю нейтрофілів в тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) [15]. Нейтрофіли поглинали і окиснювали гранули барвника НСТ з різною інтенсивністю, залежно від відновлювальної здатності ферментів, під впливом супероксид аніону (O_2^-), що утворюється в НАДФ-Н-оксидазній реакції. Кількість клітин, які спонтанно поглинули барвник (СП) підвищувалась в 2,5 рази після сенсibiliзації тварин сироваткою з низькою цитотоксичністю (група II) щодо контролю (група I). Після дії сироватки з середньою цитотоксичністю (група III), кількість клітин, які спонтанно поглинули барвник, була вище (в 1,5 рази), ніж в контролі, але нижче, ніж в групі II в 1,6 рази (табл. 2).

Після стимуляції зімозаном, відзначали зростання кількості клітин (СТ) (до $87,0 \pm 5,4\%$), що поглинули барвник після сенсibiliзації сироваткою з високою цитотоксичністю (група IV). Підвищення спонтанної окисної активності свідчило про виснаження окисного резерву нейтрофілів (табл. 2).

У всіх групах сенсibiliзованих тварин індекс стимуляції, який відображає активність НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів був нижче, ніж у контролі. Мінімальний рівень був у групі II (в 3 рази нижче контролю). У групах III і IV цей показник становив $1,9 \pm 0,01$ і $2,0 \pm 0,03$ відповідно, що свідчить про активацію ферментних систем фагоцитів (табл. 2).

Важливою сполучною ланкою між формуванням вроджених імунних реакцій і адаптивним імунітетом є білки системи комплементу, які проявляють опсонізуючу дію, а також реакції адаптивного гуморального імунітету, які формуються за рахунок утворення специфічних антитіл [7]. Поріг реактивності експериментальних тварин може визначати відповідні зміни вроджених і адаптивних гуморальних факторів імунорезистентності у відповідь на різні антигени. У сироватці крові контрольних тварин концентрація C3 компонента комплементу становила в середньому $0,61 \pm 0,07$ г/л, а концентрація C4 компонента комплементу була на рівні $9,1 \pm 2,4$ мг/дл (рис. 2 а, б).

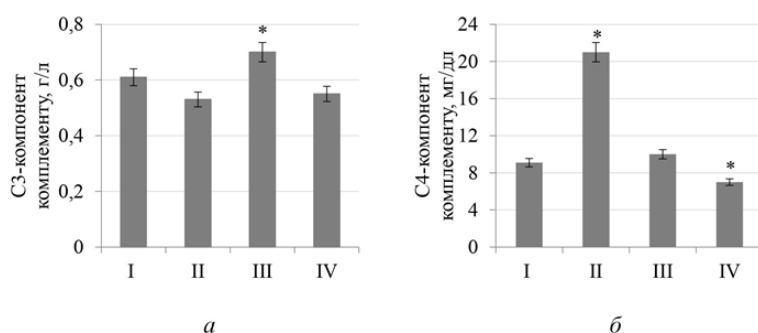


Рис. 2. Концентрація C3 (а) і C4 (б) компонентів комплементу у контрольних і сенсibiliзованих тварин

Примітка: n = 5, група I – контроль; група II – тварини, імунізовані сироваткою з низькою цитотоксичністю (М); група III – тварини, імунізовані сироваткою з середньою цитотоксичністю (МГ); група IV – тварини, імунізовані сироваткою з високою цитотоксичністю (МТ); * – достовірність відмінності з контролем $p \leq 0,05$

В групах тварин, сенсibiliзованих сироваткою з низькою (група II) і високою (група IV) цитотоксичністю, концентрація C3 компонента комплементу в середньому на 15 % була нижчою, ніж в контролі. У групі тварин, сенсibiliзованих сироваткою з середньою (група III) цитотоксичністю концентрація C3 компонента комплементу навпаки, була на 15 % вище, ніж в контролі (рис. 2а). Можна припустити, що в групі III компенсаторне зниження фагоцитарного ін-

дексу супроводжувалося компенсаторним підвищенням концентрації С3 компонента комплементу і зниженням температури (табл. 1, рис. 2а). Концентрація С4 компонента комплементу достовірно відрізнялася від контролю у тварин, сенсibilізованих сироваткою з низьким ступенем цитотоксичності (група II), і була в 2,3 рази вище, що супроводжувалося підвищенням температури тварин даної групи до кінця експерименту (рис. 1, 2б).

Таким чином, введення комплексу антигенів в організм призводило до імунологічно опосередкованого підвищення його чутливості – стану сенсibilізації, який відображав ступінь реактивності організму і ступінь імуногенності введеного матеріалу. Відомо, що реактивність організму залежить від генетичних і епігенетичних факторів, які впливають на загальне функціонування систем організму [2]. А ініціювання імуногенної відповіді залежить від багатьох чинників та сигналів, які підвищують ефективність обробки та презентації антигену [7]. Виявлене зниження поглинальної здатності нейтрофілів (табл. 2), мабуть, може бути пов'язане з недостатністю опсонізуючих чинників, таких як IgG і IgM, фрагменти компонентів комплементу С3b, С4b, С5b, білки гострої фази та ін. Також виявлено збільшення концентрації С3-конвертази (в групі тварин, імунізованих сироваткою із середнім ступенем цитотоксичності) (рис. 2а) і С4 компонента комплементу (в групі тварин, імунізованих сироваткою з низьким рівнем цитотоксичності) (рис. 2б), що може бути одним з проявів запального процесу, який характеризується втратою захисно-протосувальної функції і перетворенням її в окремий патогенний чинник [3, 13].

Висновки

1. Після імунізації тварин сироватками крові хворих з міастенією виявили зниження перетравлюючої функції нейтрофілів (індекс завершеності фагоцитозу) на 20% у кисеньнезалежному фагоцитозі в групах тварин, імунізованих сироватками із середнім (МГ) і високим (МТ) рівнем цитотоксичності.

2. У всіх групах тварин після дії імуногенних сироваток виявили дворазове збільшення в порівнянні з контролем активності ферментів нейтрофілів у спонтанному тесті в кисеньзалежному фагоцитозі.

3. Виявили виражене компенсаторне збільшення гуморального чинника вродженого імунітету – С3 компоненту комплементу в групі тварин, імунізованих сироваткою із середнім ступенем цитотоксичності (МГ), а дія сироватки з низькою цитотоксичністю (М) призводила до збільшення концентрації С4 компоненту комплементу, що вказувало на сенсibilізацію цього чинника на тлі підвищення температури тіла.

Стаття надійшла до редакції 28.02.2020

Список використаної літератури

1. Климова Е. М. Оценка степени цитотоксичности компонентов патологических сывороток с использованием клеточной тест-системы / Е. М. Климова, Е. В. Лавинская, А. И. Божков, Т. И. Кордон // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, № 6. – С. 85–92.
2. Коваленко Т. И. Иммунорезистентность экспериментальных животных разного возраста на модели генерализованного воспалительного процесса / Т. И. Коваленко, В. В. Минухин, Е. М. Климова // Світ медицини та біології. – 2015. – № 3 (52). – С. 106–109.
3. Мальцев Д. В. Дефіцит манозозв'язувального білка / Д. В. Мальцев. // Український терапевтичний журнал. – 2015. – № 1. – С. 80–90.
4. Chen L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs / L. Chen, H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, L. Zhao // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, (No 6). – P. 7204-7218. doi: 10.18632/oncotarget.23208.
5. Chernecky C. C. Laboratory tests and diagnostic procedures / C. C. Chernecky, B. J. Berger. – 5th ed. – Saunders Elsevier. – 2008. – 1232 pp.
6. Etinger R. A. HLA-DR-restricted T-cell responses to factor VIII epitopes in a mild haemophilia A family with missense substitution A2201P / R. A. Etinger, E. A. James, W. W. Kwok, A. R. Thompson, K. P. Pratt // *Haemophilia*. – 2010. – 16. – P. 44–55. DOI:10.1111/j.1365-2516.2008.01905.x
7. Foley J. H. Interplay between fibrinolysis and complement: plasmin cleavage of C3b modulates immune responses / J. H. Foley, E. A. Peterson, V. Lei, L. W. Wan, M. J. Krisinger, E. M. Conway // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2015. – Vol. 13(4). – P. 610–618. doi: 10.1111/jth.12837
8. Gonzalez-Jaramillo V. Epigenetics and Inflammatory Markers: A Systematic Review of the Current Evidence / V. Gonzalez-Jaramillo, E. Portilla-Fernandez, M. Glisic, T. Voortman, M. Ghanbari, W. Bramer, R. Chowdhury, T. Nijsten, A. Dehghan, O. H. Franco, J. Nano // *International Journal of Inflammation*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1–14. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/6273680>.
9. Jones J. C. Virus aggregating peptide enhances the cell-mediated response to influenza virus vaccine / J. C. Jones, E. W. Settles, C. R. Brandt, S. Schultz-Cherry // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – P. 7696–7703. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.133
10. Klimova E. M. Young and old animals use different strategies for forming an immune response to infectious agents (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) / E. M. Klimova, A. M. Bozhkov, T. I. Kovalenko, V. V. Minukhin, I. V. Belozarov // *Advances in Gerontology*. – 2018. – Vol. 8, No4. – P. 284–291.
11. Mahanty S. Immunogenicity of infectious pathogens and vaccine antigens / S. Mahanty, A. Prigent, O. Garraud // *BMC Immunology*. – 2015. – Vol. 16, 31 – P. 1–6. doi: 10.1186/s12865-015-0095-y.
12. Marsland A. L. The effects of acute psychological stress on circulating and stimulated inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis / A. L. Marsland, C. Walsh, K. Lockwood, N. A. John-Henderson // *Brain, behavior, and immunity*. – 2017. – Vol. 64. – P. 208–219. doi: 10.1016/j.bbi.2017.01.011.
13. Mohanan D. Administration routes affect the quality of immune responses: a cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems / D. Mohanan, B. Slutter, M. Henriksen-Lacey, W. Jiskoot, J. A. Bouwstra, Y. Perrie, T. M. Kündig, B. Gander, P. Johansen // *Journal control release*. – 2010. – Vol. 147. – P. 342–349. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.012.
14. Muniz-Junqueira M. I. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes / M. I. Muniz-Junqueira, L. M. Peçanha, V. L. Silva-Filho, M. C. A. Cardoso, C. E. Tosta // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. – 2003. – Vol. 10. – P. 1096–1102. doi:10.1128/cdli.10.6.1096-1102.2003.
15. Park B. H. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils: A diagnostic acid / B. H. Park, S. M. Fikrig, E. M. Smithwick // *Lancet*. – 1968. – Vol. 2. – P. 532–534. doi:10.1016/s0140-6736(68)92406-9.
16. Sethu S. Immunogenicity to biologics: mechanisms, prediction and reduction / S. Sethu, K. Govindappa, M. Alhaidari, M. Pirmohamed, K. Park, J. Sathish // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*. – 2012. – Vol. 60 (5). – P. 331–344. doi:10.1007/s00005-012-0189-7.

17. Van Beers M. M. On the role of aggregates in the immunogenicity of recombinant human interferon beta in patients with multiple sclerosis / M. M. van Beers, W. Jiskoot, H. Schellekens // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. – 2010. – Vol. 30. – P. 767–775. doi:10.1089/jir.2010.0086
18. Webb D. R. Animal models of human disease: inflammation / D. R. Webb // *Biochemical pharmacology*. – 2014. – Vol. 87, 1. – P. 121–130. doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.014.

**E. M. Klimova^{1,2}, A. I. Bozhkov², S. V. Sushkov¹, E. V. Lavinska^{1,2},
E. A. Bychenko^{1,2}, A. N. Agarkova¹, V. I. Vorfolomeeva¹, N. I. Kurguzova²**
¹V. T. Zaitcev Institute of General and Urgent Surgery of National Academy
of Medical Sciences of Ukraine, Diagnostic Laboratory with Immunoenzyme
and Immunofluorescence Analysis,
Balakirev vyizd, 1, Kharkiv, 61103, Ukraine, elena.lavinskaya@ukr.net
²V. N. Karazin Kharkiv National University, Department of Molecular Biology
and Biotechnology, Svobody Sq., 4, Kharkiv, 61000, Ukraine.

IMMUNOPHYSIOLOGICAL EFFECTS IN EXPERIMENTAL ANIMALS AFTER ADMINISTRATION OF MYASTHENOGENIC SERUMS WITH VARYING DEGREES OF CYTOTOXICITY

Abstract

Introduction. The action of foreign antigens on the body leads to its sensitization, reflecting the degree of reactivity of the organism and the degree of immunogenicity of the introduced material. The animal immunization model can be used to elucidate the nature of various antigenic agents, including myasthenogenic factors. It is of interest to assess the nature of the impact of immunogenic myasthenogenic factors on the immune system (phagocytosis, opsonizing complement factors).

Aim. To estimate the immunophysiological effects after animals' immunization with myasthenogenic blood serum with varying cytotoxicity degrees obtained from patients with thymus-independent and thymus-dependent myasthenia.

Methods. The animals were immunized 4 times with myasthenogenic serums with different levels of cytotoxicity: M – myasthenia gravis without morphological and functional thymus changes (low cytotoxicity), MH – myasthenia gravis with thymus hyperplasia (medium cytotoxicity), MT – myasthenia gravis with thymoma (high cytotoxicity). The activity of oxygen-independent and oxygen-dependent phagocytosis was determined using light microscopy; the concentration of C3 and C4 complement components was measured by immunoturbidimetric method.

Results. As a result of immunization, a change in temperature was detected in animals as a reaction to the administration of immunogenic myasthenogenic serum. In animals immunized with serums with medium and high cytotoxicity, a decrease in the adhesive properties (phagocytic index) of phagocytic neutrophils by 1.7 and 1.5 times, respectively, and a 20 % decrease in the digesting function of neutrophils (index of phagocytosis completion) compared with the control was revealed. In all immunized animals, the stimulation index reflecting the activity of NADPH-N-oxidase neutrophils was reduced. After the action of myasthenogenic serum with low and high

levels of cytotoxicity, the concentration of the C3 component of the complement was 15 % lower than the control. The administration of the highly cytotoxic serum led to an increase in the concentration of the C3 complement component against a decrease in temperature. A twofold increase in the concentration of the C4 complement component in animals sensitized with the serum with a low degree of cytotoxicity was accompanied by an increase in temperature.

Conclusion. Myasthenogenic serums of varying cytotoxicity degrees sensitized innate immunity factors – phagocytosis and complement proteins, which led to a violation in the processes of opsonization, absorption, processing and presentation of the antigen, and was accompanied by a change in physiological parameters.

Keywords: immunization; myasthenogenic serum; cytotoxicity; phagocytosis; complement.

References

1. Klimova E. M., Lavinskaya E. V., Bozhkov A. I., Kordon T. I. (2010) «*Estimation of the cytotoxicity degree of components of pathological serums with use of the cellular test-system*» [«Otsenka stepeny tsytotoksychnosti komponentov patolohycheskykh syvorotok s yspolzovanyem kletochnoi test-systemy»], *Biotechnology*, 3, 6, pp 85-92.
2. Kovalenko T. I., Minukhin V. V., Klimova E. M. (2015) «*Immunological resistance of experimental animals of different ages on the model of generalized inflammatory process*» [Immunorezistentnost' jeksperimental'nyh zhivotnyh raznogo vozrasta na modeli generalizovannogo vospalitel'nogo processa], *Medicine and Biology*, No. 3 (52), pp. 106-109.
3. Maltsev D. V. (2015) «*Deficiency of mannose-binding protein*» [«Defitsyt manozozviazuvalnogo bilka»], *Ukrainian Therapeutic J*, 1, pp. 80-90.
4. Chen L., Deng H., Cui H., Fang J., Zuo Z., Deng J., Li Y., Wang X., Zhao L. (2018) «*Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*», *Oncotarget*, 9, 6, pp. 7204-7218. doi: 10.18632/oncotarget.23208.
5. Chernecky C. C., Berger B. J. (2008) «*Laboratory tests and diagnostic procedures*», 5th ed., Saunders Elsevier, 1232 p.
6. Etinger R. A., James E. A., Kwok W. W., Thompson A. R., Pratt K. P. (2010) «*HLA-DR-restricted T-cell responses to factor VIII epitopes in a mild haemophilia A family with missense substitution A2201P*», *Haemophilia*, 16, pp 44-55. doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01905.x
7. Foley J. H., Peterson E. A., Lei V., Wan L. W., Krisinger M. J., Conway E. M. (2015) «*Interplay between fibrinolysis and complement: plasmin cleavage of C3b modulates immune responses*», *J Thromb Haemost*, 13(4), pp 610-618. doi: 10.1111/jth.12837
8. Gonzalez-Jaramillo V. V., Portilla-Fernandez E., Glisic M., Voortman T., Ghanbari M., Bramer W., Chowdhury R., Nijsten T., Dehghan A., Franco O. H., Nano J. (2019) «*Epigenetics and Inflammatory Markers: A Systematic Review of the Current Evidence*», *Int J Inflam*, 6273680, pp 1-14. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/6273680>.
9. Jones J. C., Settles E. W., Brandt C. R., Schultz-Cherry S. (2011) «*Virus aggregating peptide enhances the cell-mediated response to influenza virus vaccine*», *Vaccine*, 29, pp 7696–7703. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.133.
10. Klimova E.M., Bozhkov A.M., Kovalenko T.I., Minukhin V.V., Belozherov I.V. (2018) «*Young and old animals use different strategies for forming an immune response to infectious agents (Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli)*», *Advances in Gerontology*, 8, 4, pp. 284–291. doi: <https://doi.org/10.1134/S2079057018040082>
11. Mahanty S., Prigent A., Garraud O. (2015) «*Immunogenicity of infectious pathogens and vaccine antigens*», *BMC Immunology*, 16, 31, pp 1-6. doi: 10.1186/s12865-015-0095-y.

12. Marsland A. L., Walsh C., Lockwood K., John-Henderson N. A. (2017) «The effects of acute psychological stress on circulating and stimulated inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis», *Brain Behav Immun*, 64, pp 208-219. doi: 10.1016/j.bbi.2017.01.011.
13. Mohanan D., Slutter B., Henriksen-Lacey M., Jiskoot W., Bouwstra J. A., Perrie Y., Kündig T. M., Gander B., Johansen P. (2010) «Administration routes affect the quality of immune responses: a cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems», *J control release*, 147, pp 342-349. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.012.
14. Muniz-Junqueira M. I., Peçanha L. M., Silva-Filho V. L., Cardoso M. C. A., Tosta C. E. (2003) «Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes», *Clin Diagn Lab Immunol*, 10, pp 1096-1102. DOI:10.1128/cdli.10.6.1096-1102.2003.
15. Park B. H., Fikrig S. M., Smithwick E. M. (1968) «Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils: A diagnostic acid», *Lancet*, 2, pp 532-534. DOI:10.1016/s0140-6736(68)92406-9.
16. Sethu S., Govindappa K., Alhaidari M., Pirmohamed M., Park K., Sathish J. (2012) «Immunogenicity to biologics: mechanisms, prediction and reduction», *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 60 (5), pp 331-344. doi:10.1007/s00005-012-0189-7.
17. Van Beers M. M., Jiskoot W., Schellekens H. (2010) «On the role of aggregates in the immunogenicity of recombinant human interferon beta in patients with multiple sclerosis», *J Interferon Cytokine Res*, 30, pp 767-775. doi:10.1089/jir.2010.0086.
18. Webb D. R. (2014) «Animal models of human disease: inflammation», *Biochemical pharmacology*, 87, 1, pp 121-130. doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.014.