

Нові активатори завершення фагоцитозу для запобігання реактивації туберкульозного процесу

Інститут мікробіології та імунології
ім. І. І. Мечникова НАМН України

Мартинов А.В., Романова О.А., Погоріла М.С.,
Сидоренко Т.А., Ігумнова Н.І.,
Юхименко В.І., Щербак О.М.

Вступ

Туберкульоз є одним з провідних інфекційних захворювань, яке щорічно забирає більше мільйону життів у всьому світі. В глобальному масштабі у рамках систем ООН, ВОЗ та інших міжнародних організацій проводиться комплекс протитуберкульозних заходів. Проте в умовах пандемії COVID-19, а також враховуючи фактори низького ВВП на душу населення, бідності, відсутності соціального захисту і складної економічної ситуації у багатьох країнах світу, багатовекторні дії з боротьби з різними детермінантами туберкульозу та його наслідками є недостатньо ефективними [1].

Статистика захворюваності на туберкульоз свідчить про те, що з кожних 100 інфікованих мікобактерією туберкульозу (МБТ) тільки у 10 виникають відкриті форми туберкульозу [2]. У інших пацієнтів, позитивних на манту та / або гамма-інтерферон - тест, туберкульоз не виникає взагалі і не спостерігається ніяких ознак крім сенсibiliзації на антигени МБТ і наявності антитіл до ESAT6 в крові [3].

Макрофаги, а також дендритні клітини виконують в організмі функцію фагоцитозу і перетравлювання МБТ, тим самим виявляючи здатність до безпосереднього придушення їх розмноження. Під час дії природженого імунітету макрофаги експресують різноманітні поверхневі рецептори, за допомогою яких відбувається розпізнавання ендогенних бактеріальних лігандів. Макрофаги й ДК, які вперше фагоцитують МБТ, є неактивованими. Якщо ж відбувається контакт рецептору альвеолярного макрофагу з МБТ, включаються механізми фагоцитозу. За злиття фагосоми, що містить МБТ, з лізосою макрофагу, утворюється фаголізосома, в результаті процесингу в якій МБТ фрагменти мікобактерії презентуються на поверхні макрофагальної клітини. Проте, виходи потрапляння МБТ у фаголізосому можуть бути різними: перетравлення її макрофагом; збереження (виживання) її у макрофагу; внутрішньоклітинне розмноження МБТ і загибель макрофага.

За незавершеного фагоцитозу МБТ відбувається апоптоз (програмувана загибель інфікованих макрофагів), забезпечуючи тим самим важливий зв'язок з адаптивним імунітетом, оскільки апоптозні везикули містять антигени МБТ, які захоплюють ДК. Останні презентують ці антигени незрілим (naïve) Т-клітинам, стимулюючи їх активацію. Проте МБТ здатні пригноблювати апоптоз і зберігатися всередині макрофагів. Недостатня ефективність природженого імунітету у ліквідації МБТ і уповільнений розвиток адаптивного імунітету сприяють прогресуванню

туберкульозного процесу. Формування туберкульозної гранульоми та її подальша доля залежать від балансу між здатністю високоактивних макрофагів знищувати МБТ і можливістю останніх руйнувати макрофаги, залишаючись життєздатними.

Таким чином, якщо акцентувати увагу не на інфікуванні, а на запобіганні реактивації туберкульозу, можна значно скоротити кількість хворих з клінічними проявами. Сучасні відомості про імунологічний бік можливого перебігу туберкульозу обґрунтовують необхідність застосування фармацевтичних засобів, які б сприяли процесу повного перетравлення макрофагами поглинутих мікобактерій - процесу завершення фагоцитозу. Подібний підхід є способом фармацевтичного впливу на туберкульоз на найбільш ранніх етапах патогенезу хвороби. Виходячи з цього, **метою** даного дослідження була розробка і перевірка нових речовин, здатних до потенціювання фагоцитозу МБТ і стимуляції адаптивного імунітету.

Матеріали і методи

У роботі використовували самців безпорідних лабораторних мишей, віком 2 місяці, вагою 20-22 грами, загальною кількістю 81 тварина, що перебували у віварії ДУ «ІМІ НАМН України», м. Харків на стандартному харчуванні та за регламентованих умов утримання. Тварин утримували при постійній температурі (20-25 °С) та відносній вологості повітря (50-70%). Раціон та якість води були стандартними, доступ до води був необмеженим. Тварини були розміщені у клітках групами за статтевою ознакою. Усі роботи з тваринами проводились згідно ОСТ 42 1-88 «Тварини лабораторні. Технологічний процес» з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях від 18.03.1986, Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і МОЗУ №281 від 01.11.2000р. [4]. Модель заснована на попередньому в/ч введенні гідрокортизону ацетату у дозі 250 мг/кг, коли на третю добу після цього здійснювали в/ч введення БЦЖ в дозі 0,5 мг на мишу в ізотонічному розчині NaCl, таким чином, мишей інфікували внутрішньочеревно об'ємом суспензії 0,1 мл на мишу. Мишам контрольної групи вводили в/ч ізотонічний розчин NaCl. Постановку реакції завершеності фагоцитозу проводили через 1 добу після БЦЖ-інфікування. Після постановки реакції зі *Staphylococcus aureus* ATCC 309, облік результатів здійснювався за допомогою світлової мікроскопії під імерсійним збільшенням. З метою дослідження впливу вказаних субстанцій та їх сумішей на функціональну активність лімфоцитів *in vivo* та *in vitro* використовували загальноприйняту РБТЛ на поліклональний Т-клітинний мітоген ФГА [5]. Лімфоцити отримували з клітинних суспензій селезінки мишей для тестування препаратів *in vivo* та з цільної крові людей - *in vitro*. Експресію рецепторів до еритроцитів морської свинки на лімфоцитах мишей в присутності досліджуваних речовин визначали за тестом Е-розеткоутворення [6]. Перед виконанням реакції виділені спленоцити інкубували з препаратами

протягом 60 хвилин при $t = 37^\circ\text{C}$. Функціональну активність перитонеальних макрофагів оцінювали *in vivo* за здатністю цих клітин до фагоцитозу з визначенням індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ), що обчислюється як відношення середнього числа поглинутих мікробів через 30 хв інкубації до середнього числа поглинутих мікробів через 120 хв інкубації. Функціональну активність нейтрофілів периферичної крові досліджували *in vitro*. Задля цього використовували гепаринізовану кров здорових донорів, 22 чоловіків віком 20 – 30 років. Постановка реакції фагоцитозу здійснювалася методом [5]. Об'єктом фагоцитозу *in vitro* та *in vivo* слугували бактерії *Staphylococcus aureus* ATCC 309.

Результати та обговорення

У проведених нами дослідженнях у якості селективного активатора функціональної активності фагоцитів і лімфоцитів був випробуваний біс-сукциніллізин, який було включено до певної фармацевтичної композиції у вигляді сукцинілформілізину (СФЛ).

Було показано, що преінкубація лімфоцитів периферичної крові із сукцинілформілізином

призводить до підвищення відсотку лімфоцитів, що піддаються спонтанній та фітогемаглютинін-стимульованій бласттрансформації порівняно із контролем – $(28,20 \pm 1,14)\%$ проти $(15,14 \pm 1,48)\%$, та $(35,28 \pm 2,91)\%$ проти $(24,34 \pm 1,22)\%$, відповідно, ($p < 0,05$) (табл. 1). Рівень спонтанної РБТЛ, що підвищується за дії СФЛ свідчить про здатність досліджуваної речовини потенціювати функціональну активність Т-лімфоцитів, демонструючи підвищення проліферативного потенціалу та здатності, зокрема, до відповіді на неспецифічний антиген популяції лімфоцитів, відповідальних за клітинний імунітет.

Відсоток лімфоцитів, що зв'язувалися із ксеногенними еритроцитами під дією СФЛ мав тенденцію до підвищення порівняно із контролем – $(69,37 \pm 4,1)\%$ проти $(61,18 \pm 5,3)\%$, ($p < 0,1$) (табл. 1).

Ці дані свідчать про здатність сукцинілформілізину підвищувати функціональну активність Т-лімфоцитів, виступаючи, вірогідно, агентом демаскування Е-рецептору на мембрані досліджуваних клітин.

Таблиця 1. Вплив сукцинілформілізину на функціональні характеристики лімфоцитів і фагоцитів *in vitro*, ($M \pm \sigma$)

Фармакологічні речовини	РБТЛ спонт., %	РБТЛ індук. ФГА, %	Експресія рецепторів на лф, %	ФЧ ПМФ 30 хв, ум. од.	ФЧ ПМФ 120 хв., ум. од.	ІЗФ, %
Контроль	15,14±1,48	24,34±1,22	61,18±5,3	6,20±0,32	4,3±0,38	1,44
СФЛ	28,20±1,14 ¹⁾	35,28±2,91 ¹⁾	69,37±4,1 ²⁾	5,50±0,24 ¹⁾	2,5±0,36 ¹⁾	2,20

¹⁾ – достовірність відмінності даних відносно контролю, $p < 0,05$; ²⁾ - достовірність відмінності даних відносно контролю, $p < 0,1$.

Сумісна інкубація СФЛ та нейтрофілів периферичної крові у тестах *in vitro* призводила до підвищення індексу завершеності фагоцитозу в 1,5 рази порівняно з групою контролю. Результати наведеного тесту впевнено свідчать на користь здатності сукцинілформілізину сприяти функціональній активності фагоцитів крові, підвищуючи інтегральний показник фагоцитарної активності - перетравлювальну здатність вказаних клітин.

Дослідження дії сукцинілформілізину за його введення *in vivo* на реакцію рецепторного апарату Т-лімфоцитів селезінки мишей, інфікованих БЦЖ в

умовах дексаметазонового імунодефіциту продемонструвало збереження експресії рецепторів під дією сукцинілформілізину у розведенні 1:100, ($p < 0,05$) (табл. 2).

У мишей, інфікованих БЦЖ, індекс завершеності фагоцитозу складав 1,04, що знаходиться на межі норми. Рівень даного показника у мишей інфікованих БЦЖ свідчить про недостатню функціональну активність перитонеальних макрофагів з огляду на середнє число поглинутих мікробів через 120 хвилин інкубації, що не зазнав очікуваного зниження притаманного групі інтактних тварин.

Таблиця 2. Вплив сукцинілформілізину на функціональні характеристики лімфоцитів і фагоцитів *in vivo*, ($M \pm \sigma$)

Групи тварин, (n=11)	РБТЛ спонт., %	РБТЛ індук. ФГА, %	Експресія рецепторів на лф, %	ФЧ ПМФ 30 хв (ум. од.)	ФЧ ПМФ 120 хв (ум. од.)	ІЗФ, %
Інтактні тварини	18,34±1,52	67,41±3,18	27,9±1,72	7,3±0,45	4,3±0,38	1,69
БЦЖ+Дексаметазон	8,04±0,52 ¹⁾	36,51±3,42	9,07±0,86 ¹⁾	2,6±0,33 ¹⁾	2,5±0,12 ¹⁾	1,04
СФЛ+БЦЖ+ Дексаметазон	15,46±1,22 ²⁾	52,34±3,77 ^{1),2)}	24,3±2,0	6,7±0,41 ^{1),2)}	4,5±0,36 ^{1),2)}	1,48

¹⁾ – достовірність відмінності даних відносно інтактних тварин, $p < 0,05$; ²⁾ - достовірність відмінності даних відносно групи із інфікуванням БЦЖ на фоні дексаметазонавої імуносупресії, $p < 0,05$.

Введення СФЛ мишам, інфікованим БЦЖ, сприяло достовірному підвищенню індексу завершеності фагоцитозу перитонеальних макрофагів – 1,48, порівняно з групою мишей, яким за БЦЖ інфікування не застосовували жодних препаратів – 1,04.

Крім того, ми спостерігали в експерименті *in vivo* підвищення стимульованої ФГА (в 1,4 рази) і спонтанної бласттрансформації лімфоцитів (у 1,8 рази) після введення СФЛ в порівнянні з групою без його застосування, ($p < 0,05$). Також ми спостерігали, що СФЛ здатний до активації функціональної активності лімфоцитів мишей інфікованих БЦЖ, підвищуючи експресію рецепторів на цих клітинах в 2,7 рази порівняно із мишами, інфікованими БЦЖ без застосування досліджуваної субстанції, приводячи рівень цього показника до нормальних значень (табл. 2).

Таким чином, досліджувана сполука СФЛ продемонструвала статистично достовірно вищу здатність до активації експресії рецепторного апарату

T-лімфоцитів периферичної крові людей *in vitro* порівняно із негативним контролем.

Застосування СФЛ *in vivo* справляло стимулюючий вплив щодо функціональної активності макрофагів, підвищуючи індекс завершеності фагоцитозу.

Дослідження абсолютного числа формених елементів крові показало (табл. 3), що введення СФЛ сприяло підвищенню числа лейкоцитів в 1,5 рази порівняно з групою без застосування СФЛ.

Відносне число еозинофілів крові було нижче в 2,7 разів за застосування СФЛ, ніж у групи мишей інфікованих БЦЖ та було на рівні інтактних тварин. У мишей інфікованих БЦЖ спостерігається значне зростання паличкоядерних нейтрофілів – в 2,6 разів – порівняно зі значеннями у інтактних тварин. За введення СФЛ мишам інфікованим БЦЖ підвищення відсотка паличкоядерних нейтрофілів було не настільки суттєвим, хоча і не набувало значень інтактних тварин ($5,46 \pm 0,32$) % проти ($8,09 \pm 0,34$) %, ($p < 0,05$).

Таблиця 3. Вплив сукцинілформіллізину на показники лейкограми *in vivo*, (M±σ)

Групи тварин, (n=11)		Лейкоцити, 10^9 /л	Еозинофіли, %	П/Я нейтрофіли, %	С/Я нейтрофіли, %	Моноцити, %	Лімфоцити, %
Інтактні тварини	M	5,17	3,01	3,06	35,4	6,02	53,20
	σ	±0,31	±0,2	±0,28	±2,81	±0,4	±0,37
БЦЖ+ Декс-он	M	3,10	6,51	8,09	28,03	10,1	44,18
	σ	±2,60 ¹⁾	±0,43 ¹⁾	±0,34 ¹⁾	±1,82 ¹⁾	±0,72 ¹⁾	±0,32 ¹⁾
СФЛ+ БЦЖ+ Декс-он	M	4,81	2,40	5,46	30,5	6,20	49,87
	σ	±0,3 ²⁾	±0,52 ²⁾	±0,32 ^{1),2)}	±2,21 ²⁾	±0,62 ²⁾	±0,26 ²⁾

¹⁾ – достовірність відмінності даних відносно інтактних тварин, $p < 0,05$. ²⁾ - достовірність відмінності даних відносно групи із інфікуванням БЦЖ на фоні дексаметазонавої імуносупресії, $p < 0,05$.

Інфікування БЦЖ призвело до достовірного зниження відносного числа сегментоядерних нейтрофілів (у 1,3 рази) порівняно з нормою. У разі введення СФЛ достовірної відмінності між відносними числами сегментоядерних нейтрофілів у тварин цієї групи та інтактними тваринами не реєструвалося. За інфікування БЦЖ відбувається підвищення рівня моноцитів – ($10,1 \pm 0,72$) % проти ($6,02 \pm 0,4$) % і зменшення рівня лімфоцитів – ($44,18 \pm 0,32$) % проти ($53,20 \pm 0,37$)%, ($p < 0,05$), що коректується шляхом введення СФЛ – ($6,20 \pm 0,62$) % і ($49,87 \pm 0,26$) % без статистичних розбіжностей із відносним рівнем моноцитів і лімфоцитів у групи інтактних тварин.

Нашими попередніми дослідженнями було встановлено здатність до гальмування активності уреазі діпріоном, виявлено стабільність композиції діпріону та холекальциферолу в стрес-тесті методом

прискороного старіння, доведено стабільність даного сполучення при екстраполяції на 24 місяці, що робить його перспективним для впровадження у промислове виробництво. Було також проведено дослідження імунотропної активності композиції діпріону та холекальциферолу *in vivo* та *in vitro* відносно функціональної здатності макрофагів та лімфоцитів на моделі інфікованих МБТ тварин.

Відсоток лімфоцитів, що зв'язувалися із ксеногенними еритроцитами під дією композиції діпріону та холекальциферолу, мав тенденцію до підвищення порівняно із контролем – ($78,11 \pm 5,1$) % проти ($60,15 \pm 5,5$) %, ($p \leq 0,1$) (табл.4).

Ці дані свідчать про здатність композиції підвищувати функціональну активність T-лімфоцитів, виступаючи, вірогідно, агентом демаскування E-рецептору на мембрані досліджуваних клітин.

Таблиця 4. Вплив композиції діпріону та кальциферолу на функціональні характеристики лімфоцитів і фагоцитів in vitro, (M±σ)

Фармакологічні речовини	РБТЛ спонт., %	РБТЛ індук. ФГА, %	Експресія рецепторів на лф, %	ФЧ ПМФ 30 хв, ум. од.	ФЧ ПМФ 120 хв, ум. од.	ІЗФ, %
Контроль	14,12±1,23	23,13±1,12	60,15±5,5	6,00±0,21	4,2±0,36	1,43
Композиція діпріону та кальциферолу	30,11±2,02 ¹⁾	37,23±2,76 ¹⁾	78,11±5,2 ²⁾	5,40±0,20 ¹⁾	2,4±0,34 ¹⁾	2,22

¹⁾ – достовірність відмінності даних відносно контролю, $p < 0,05$; ²⁾ – достовірність відмінності даних відносно контролю, $p < 0,1$.

Спільна інкубація композиції та нейтрофілів периферичної крові у тестах in vitro приводила до підвищення індексу завершеності фагоцитозу в 1,5 рази порівняно з групою контролю. Результати наведеного тесту впевнено свідчать на користь здатності композиції сприяти функціональній активності фагоцитів крові, підвищуючи інтегральний показник фагоцитарної активності – перетравлювальну здатність вказаних клітин.

Дослідження дії композиції діпріону та кальциферолу in vivo на реакцію рецепторного апарату Т-лімфоцитів селезінки мишей, інфікованих БЦЖ в

умовах дексаметазонового імунодефіциту, продемонструвало збереження експресії рецепторів під дією композиції у розведенні 1:100, ($p < 0,05$) (табл. 5).

У мишей, інфікованих БЦЖ індекс завершеності фагоцитозу складав 1,02, що знаходиться на межі норми. Рівень даного показника у мишей, інфікованих БЦЖ, свідчить про недостатню функціональну активність перитонеальних макрофагів з огляду на середнє число поглинутих мікробів через 120 хв інкубації, що не зазнало очікуваного зниження, притаманного групі інтактних тварин.

Таблиця 5. Вплив композиції діпріону та кальциферолу на функціональні характеристики лімфоцитів і фагоцитів in vivo, (M±σ)

Групи тварин	РБТЛ спонт., %	РБТЛ індук. ФГА, %	Експресія рецепторів на лф, %	ФЧ ПМФ 30 хв, ум. од.	ФЧ ПМФ 120 хв, ум. од.	ІЗФ, %
Інтактні тварини	18,20±1,47	65,33±3,15	28,3±1,82	7,2±0,3	4,2±0,4	1,71
БЦЖ+ дексаметазон	8,11±0,49 ¹⁾	35,53±3,33	9,11±0,72 ¹⁾	2,5±0,2 ¹⁾	2,6±0,1 ¹⁾	1,02
Композиція +БЦЖ+ дексаметазон	15,79±1,32 ²⁾	58,88±3,85 ^{1),2)}	26,7±2,2	6,9±0,6 ^{1),2)}	4,8±0,9 ^{1),2)}	1,68

¹⁾ – достовірність відмінності даних відносно інтактних тварин, $p < 0,05$; ²⁾ – достовірність відмінності даних відносно групи із інфікуванням БЦЖ на фоні дексаметазонової імунодепресії, $p < 0,05$.

Інгаляційне введення композиції діпріону та холекальциферолу мишам, інфікованим БЦЖ, сприяло достовірному підвищенню індексу завершеності фагоцитозу перитонеальних макрофагів – 1,68 порівняно з групою мишей, яким за БЦЖ інфікування не застосовували жодних фармацевтичних засобів (1,02). В перерахунку на діпріон однократна доза складала 35 мг/кг.

Крім того, ми спостерігали в експерименті in vivo підвищення стимульованої ФГА (в 1,6 разів) і спонтанної бласттрансформації лімфоцитів (у 1,9 разів) після введення діпріону та кальциферолу в порівнянні з групою без його застосування, ($p < 0,05$). Також ми спостерігали, що композиція є здатною до активації функціональної активності лімфоцитів мишей інфікованих БЦЖ, підвищуючи експресію рецепторів на цих клітинах в 2,8 разів порівняно із мишами, інфікованими БЦЖ без застосування

досліджуваної субстанції, приводячи рівень цього показника до нормальних значень (табл. 5).

Таким чином, досліджувана композиція продемонструвала статистично достовірно вищу здатність до активації експресії рецепторного апарату Т-лімфоцитів периферичної крові людей in vitro порівняно із негативним контролем.

Інгаляційне застосування композиції діпріону та холекальциферолу in vivo також справляло стимулюючий вплив щодо функціональної активності макрофагів підвищуючи індекс завершеності фагоцитозу.

Висновки

1. В тестах in vitro досліджуваний активатор завершення фагоцитозу сукцинілформілізін підвищував функціональну активність Т-лімфоцитів та нейтрофілів в концентраціях 0,1 – 1 мкг/мл.

2. В експерименті на мишах, інфікованих БЦЖ на фоні дексаметазонавої імунодепресії, застосування сукцинілформілізину сприяє підвищенню функціональної активності Т-лімфоцитів та перитонеальних макрофагів порівняно із контролем, а також нормалізує показники лейкограми крові.

3. Найбільш стабільна композиція на основі холекальциферолу та дипіرونу була нами відібрана для подальшого створення профілактичного засобу задля запобігання реактивації латентного туберкульозу. Вказана композиція достовірно збільшує індекс завершеного фагоцитозу при аерозольному введенні мишам та здатна зберігатися протягом 2 років без суттєвої руйнації в рідкому стані.

New activators for the completion of phagocytosis to prevent the reactivation of the tuberculosis process

Martynov AV, Romanova OA, Pogorila MS, Sidorenko TA, Igunnova N.I, Yukhimenko VI, Shcherbak OM

In order to develop dosage forms for the prevention of reactivation of latent tuberculosis, several pharmaceutical compositions were synthesized, from which the most effective activator of phagocytosis completion - succinylformyllysine - was selected. It was found that the use of succinylformillisin increases the functional activity of T-lymphocytes and peritoneal macrophages, normalizes the leukogram of the blood. The most effective composition of diprion and cholecalciferol, capable of inhibiting mycobacterial urease and selective activation of the functional ability of phagocytes and lymphocytes, has also been developed. The aerosol mixture based on these compounds is able to reduce by

37% the number of macrophages with incomplete phagocytosis in the lungs of mice infected with BCG on the background of immunosuppression.

Keywords: activators for the completion of phagocytosis, prevent the reactivation of the tuberculosis process

References

1. Floyd K., Glaziou Ph., Zumla A., Raviglione M. The global tuberculosis epidemic and progress in care, prevention, and research: an overview in year 3 of the End TB era. *The Lancet*. 2018. Vol. 6, P. 299-314.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
3. Kasprowicz V. O., Churchyard G., Lawn S. D., et al. Diagnosing Latent Tuberculosis in High-Risk Individuals: Rising to the Challenge in High-Burden Areas. *J Infect Dis*. 2011. Vol.204. N. 4. P.1168–1178.
4. On animals protection from cruelty [electronic resource]: Law of Ukraine 21.02.2006 № 3447-IV amended according to Law № 1759-VI (1759-17) 15.12.2009 // Supreme Council of Ukraine. – 2010. – №9. – 76. – <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>.
5. Immunology Workshop. Cellular, molecular and genetic research methods / ed. L.V. Kovalchuk, G.A.Ignateva, L.V.Gankovskaya - M: Gootar Media, 2010. - 176 p.
6. Immunology: Workshop / E. Pasteur, V.O. Ovod, V.N. Pozur, N.E. Whistle. - K. - Vice school. - Publishing house with Kiev. Un-Those. - 1989. - 304 p.