

## ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ, ОБЩИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ОВЕЦ В ПРОЦЕССЕ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

И. Ю. Ездакова, доктор биологических наук, О. В. Капустина, доктор ветеринарных наук, А. Г. Григорьев, В. М. Ковайкина

Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук, 109428, Москва, Рязанский просп., 24/1  
E-mail: ezdakova.i@viev.ru

*Врожденный иммунитет играет важную роль в защите организма от патогенных микроорганизмов. Сегодня широко обсуждаются значение его структур при вакцинации. Цель исследования – изучение динамики иммунологических показателей в процессе иммунного ответа на различные типы вакцин. Для проведения анализа уровней естественных антител в сыворотке крови овец и возможных корреляций их параметров с показателями врожденного иммунитета в процессе поствакцинального иммунного ответа после забора крови (фон), животных иммунизировали вакциной против бешенства (n=5) и сибирской язвы (n=5). В первые сутки иммунного ответа в крови овец опытных групп произошло небольшое увеличение tot-Ig, возросло количество нейтрофилов, а число лимфоцитов уменьшилось. На 7-е сутки концентрация tot-Ig, в состав которых входят специфические антитела к антигенам вакцин против бешенства и сибирской язвы, увеличилась в 2 раза, по сравнению с фоновыми значениями. Однако концентрация NAb немного повысилась только в первые сутки иммунного ответа на вакцину против сибирской язвы. У животных вне зависимости от введенной вакцины постоянно сохранялась отрицательная корреляция между числом лимфоцитов и нейтрофилов ( $r = -0,88 \pm 0,02$ ). Как и в контроле ( $r = -0,48$ ), сохранялась отрицательная корреляция между показателями Нф/NAb ( $r = -0,52$ ;  $r = -0,76$ ) у опытных групп, что указывает на несинхронность активации фагоцитов и синтеза естественных антител. Установлена корреляционная взаимосвязь Лф/NAb в процессе иммунного ответа на вакцину против бешенства ( $r = 0,5$ ) и сибирской язвы ( $r = 0,7$ ), и ее отсутствие в контроле ( $r = 0,16$ ), что свидетельствует о реакции естественных антител на чужеродный антиген. Корреляции Лф/NAb ( $r = 0,7$ ) и Лф/tot-Ig ( $r = 0,8$ ) были выше в динамике иммунного ответа на вакцину против сибирской язвы, чем против бешенства ( $r = 0,5$ ). По всей видимости, сывороточные NAb к KLH, которые включают различные изоформы Ig, могут отражать врожденную гуморальную иммунную компетентность.*

## THE RELATIONSHIP BETWEEN THE INDICATORS OF NATURAL ANTIBODIES, TOTAL IMMUNOGLOBULINS AND IMMUNOCOMPETENT BLOOD CELLS OF SHEEP IN THE PROCESS OF POST-VACCINATION IMMUNE RESPONSE

I. Yu. Ezdakova, O. V. Kapustina, A. G. Grigoriev, V. M. Kovaikina

Federal Research Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named K. I. Scriabin and Ya. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Moskva, Ryazanskii prosp., 24/1  
E-mail: ezdakova.i@viev.ru

*Innate immunity plays an important role in protecting the body from pathogenic microorganisms. The significance of its structures in vaccination is currently widely discussed. The purpose of the research was to study the dynamics of immunological parameters during the immune response to various types of vaccines. The paper analyzes the levels of natural antibodies in the blood serum of sheep and considers possible correlations with indicators of innate immunity during the post-vaccination immune response. After blood sampling (background), the animals were immunized with rabies (n=5) and anthrax (n=5) vaccines. On the first day of the immune response in the blood of the sheep of the experimental groups, there was a slight increase in tot-Ig, the number of neutrophils increased, and the number of lymphocytes decreased. It was found that on the seven day the concentration of tot-Ig, which also includes specific antibodies to the antigens of vaccines against rabies and anthrax, increased by 2 times compared to the background values. However, the NAb concentration slightly increased only on the first day of the immune response to the anthrax vaccine. In animals, regardless of the vaccine administered, a negative correlation between the number of lymphocytes and neutrophils was constantly maintained ( $r = -0.88 \pm 0.02$ ). As well as in the control ( $r = -0.48$ ), the negative correlation between neutrophils /NAb ( $r = -0.52$ ;  $r = -0.76$ ) remained, which indicates the activation of phagocytes and the synthesis of natural antibodies. On the other hand, a correlation relationship between lymphocytes/NAb was established during the immune response to the vaccine against rabies ( $r = 0.5$ ) and anthrax ( $r = 0.7$ ), and the absence of this relationship in the control ( $r = 0.16$ ), which indicates the reaction of natural antibodies to a foreign antigen. The correlations of lymphocytes/NAb ( $r = 0.7$ ) and lymphocytes/tot-Ig ( $r = 0.8$ ) were higher in the dynamics of the immune response to the anthrax vaccine than to the rabies vaccine ( $r = 0.5$ ). It appears that serum anti-KLH NAbs, which include various Ig isotypes, may reflect innate humoral immune competence.*

**Ключевые слова:** естественные антитела, овцы, иммуноглобулины, вакцины, иммунный ответ, корреляции.

**Key words:** natural antibodies, sheep, immunoglobulins, vaccines, immune response, correlations.

Врожденный иммунитет играет важную роль не только в предотвращении инфекции, но и в поствакцинальном иммуногенезе. Один из основных гуморальных компонентов врожденной иммунной системы – естественные антитела (NAb) [1]. На сегодняшний день накоплен большой материал о важной роли естественных антител в иммунных реакциях организма [2, 3]. NAb реагируют с ДНК, фософлипидами, гистонами, различ-

ными компонентами клеток. Исследования взаимосвязи между уровнями NAb и приобретенным иммунным ответом у животных продемонстрировали положительную корреляцию между уровнями NAb и специфических антител (SpAb) [4].

Естественные антитела представляют собой полиреактивные иммуноглобулины (Ig), которые синтезируются В-клетками на антигены собственного организма, и такие

филогенетически консервативные структуры микроорганизмов, как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (РАМР) [5]. К важным РАМР относят липополисахариды, липотейхоевая кислота и пептидогликан, присутствующие на грамотрицательных и грамположительных бактериях. Но в действительности довольно трудно различить NAb от SpAb, так как и те и другие антитела взаимодействуют с РАМР микроорганизмов. Поэтому для определения естественных антител в сыворотке крови овец обычно используют гемоцианин гемолимфы морского моллюска *Megathura crenylata* (KLH), с которым животные ранее не встречались.

NAb могут быть различных изотипов, но в основном они представлены IgM, которые продуцирует субпопуляция В1-клеток. Взаимодействие естественных антител с антигеном приводит к опсонизации патогена, активизации фагоцитоза, индукции антигенозависимой клеточной цитотоксичности, активации комплемента по классическому пути и лизису. Эффекторная активность антител связана с передачей сигнала с V- на С-домены Ig, что индуцирует связывание Fc-фрагмента с Fc-рецептором клетки [6]. С другой стороны, специфические антитела синтезируются субпопуляцией В2-клеток в ответ на определенный чужеродный антиген и распознают только его. В отличие от них, NAb характеризуются широким репертуаром специфичности, включая собственные и чужеродные структуры, такие как углеводы и гликолипиды, обычно с низкой аффинностью [7]. Специфические антитела высокоаффинны, но более ограничены в распознавании антигенов, чем NAb. Благодаря своей полиреактивности NAb играют уникальную роль в иммунной системе. Их высокие уровни в сыворотке крови связаны с повышенной выживаемостью кур-несушек и овец, а у коров концентрация NAb в молоке положительно связана с устойчивостью к маститу. Высокие уровни полиреактивных NAb в сыворотке и слизистой оболочке млекопитающих и птиц свидетельствуют о важных эффекторных и регуляторных иммунных функциях. Результаты исследований свидетельствуют, что NAb выступают в качестве первой линии защиты от патогенов и их оценка представляет собой потенциальный маркер состояния здоровья животных [8, 9]. Понимание роли NAb во врожденных и адаптивных реакциях иммунной системы организма может иметь решающее значение для производства эффективных вакцин, разработки новых методов иммунодиагностики.

Вместе с тем, по данным Sinyakov M. S. et al (2006), что уровень специфических антител может отрицательно коррелировать с уровнями NAb. Естественные антитела могут связываться со специфическим антигеном и препятствовать специфическому взаимодействию, которое более эффективно из-за аффинности SpAb. Следствием этого может быть неэффективность вакцины, которая связана с использованием определенных антигенов, на которые уже в организме существуют естественные антитела.

Ранее мы установили, что поствакцинальный иммунный ответ на различные по молекулярной структуре антигены значительно отличается в количественной динамике показателей иммунокомпетентных клеток крови и сывороточных иммуноглобулинов [10, 11]. Сведения о динамике NAb и их взаимосвязи с общими иммуноглобулинами (tot-Ig) в печати крайне малочисленны.

Цель исследования – изучение динамики естественных и общих иммуноглобулинов в циркулирующей крови овец и их взаимосвязи с показателями иммунокомпетентных клеток врожденного (нейтрофилы) и адаптивного (лимфоциты) иммунитета в процессе поствакцинального иммунного ответа на различные типы вакцин для поиска новых диагностических критериев оценки формирования механизмов иммунного ответа.

**Методика.** После забора крови (фон) животных иммунизировали. Овцам романовской породы (n=5) первой опытной группы подкожно вводили антирабическую вакцину (по 3,0 мл), второй (n=5) – вакцину против сибирской язвы (1,0 мл). Особям контрольной группы вводили физиологический раствор. На 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 9-е сутки после инъекции определяли относительное содержание иммунокомпетентных клеток крови и уровень NAb и tot-Ig в сыворотке крови. Животные содержались в соответствии с ГОСТ 33215-2014.

Уровни NAb определяли методом непрямого ТФ ИФА. Планшеты для микротитрования сенсibilизировали антигеном, против которых овцы иммунологически наивны. В качестве антигена использовали Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) гемоцианин гемолимфы морского моллюска *Megathura crenylata* (MP Biomedicals, Solon, OH). Исследуемые сыворотки овец вносили в разведении 1:200. В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена IgG кролика против Ig овец. Для эксперимента были отобраны животные, у которых оптическая плотность (ОП<sub>405</sub>) NAb в сыворотке крови была в пределах 1,3...1,5.

Общий уровень иммуноглобулинов (tot-Ig) определяли в реакции простой радиальной иммунодиффузии, относительное количество лейкоцитов в крови овец – по стандартной методике. Для изучения функциональных связей в процессе поствакцинального иммунного ответа использовали корреляционный анализ показателей иммунокомпетентных клеток крови и уровня сывороточных иммуноглобулинов (tot-Ig, NAb). Ход и порядок исследования был одобрен Комиссией по биотехнике ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 3 от 23.01.2023 г.).

**Результаты и обсуждение.** В первые сутки иммунного ответа количество нейтрофилов в крови животных опытных групп возрастало, а число лимфоцитов уменьшалось (см. табл.). Этот процесс может быть связан с перераспределением лимфоцитов из системной циркуляции в лимфоидные органы, где происходит дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки.

**Количественная характеристика иммунологических показателей в процессе поствакцинального иммунного ответа**

| Показатель                                      | фон      | 1-е сутки | 3-и сутки | 5-е сутки | 7-е сутки | 9-е сутки |
|---|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>1 группа (антирабическая вакцина)</b>        |          |           |           |           |           |           |
| tot-Ig, мг/мл                                   | 12,0±0,4 | 16,0±1,0  | 10,0±0,8  | 12,0±1,5  | 24,5±1,9* | 24,5±1,3* |
| Нейтрофилы, %                                   | 34,7±1,4 | 51,0±10,2 | 38,0±7,7  | 39,0±10,0 | 45,6±5,4  | 38,3±5,3  |
| Лимфоциты, %                                    | 62,3±1,7 | 35,7±9,3  | 48,3±6,3  | 57,0±9,0  | 37,0±4,5  | 45,6±0,6  |
| <b>2 группа (вакцина против сибирской язвы)</b> |          |           |           |           |           |           |
| tot-Ig, мг/мл                                   | 10,0±1,2 | 12,0±3,0  | 12,0±1,4  | 24,5±6,5* | 24,5±4,0* | 24,5±2,5* |
| Нейтрофилы, %                                   | 38,6±6,0 | 62,3±9,7  | 67,3±4,6  | 47,6±8,8  | 52,6±3,3  | 52,0±5,1  |
| Лимфоциты, %                                    | 59,0±6,2 | 31,3±9,3  | 23,6±5,8* | 45,0±7,5  | 34,0±3,5  | 39,6±4,7  |

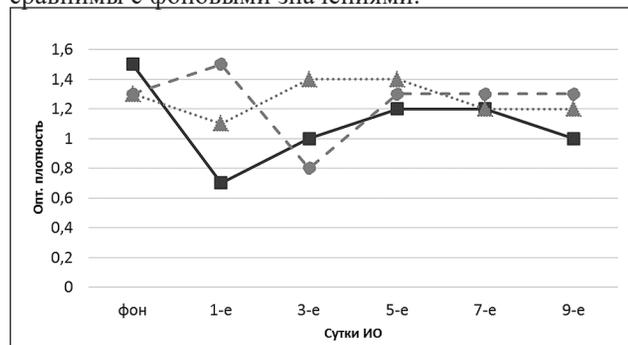
\*различия, по сравнению с фоновым значением, достоверны  $p < 0,05$ .

Одновременно у животных опытных групп произошло небольшое увеличение tot-Ig, что связано с активацией всех компонентов иммунной системы в ответ на введение чужеродного антигена. Далее в опытных группах овец наблюдали увеличение концентрации tot-Ig в сыворотке крови, но во второй группе ее повышение зарегистрировано на 5-е сутки, а в первой группе только на 7-е сутки поствакцинального иммунного ответа. В контрольной группе в крови овец количество нейтрофилов в течение 10 суток наблюдений не превышало 36,0 %, лимфоцитов – не опускалось ниже 55,0 %. Уровень общих иммуноглобулинов в контрольной группе был сравним с фоновыми показателями в опытных группах овец.

Так как естественные антитела играют важную роль в первой линии защиты животных от патогенов, попавших в организм, показатели NAb могут отражать состояние естественной резистентности. Естественные антитела, связывающиеся с KLN, не будут непосредственно защищать от бактериальных и вирусных инфекций, но как показывают эксперименты, их уровень коррелирует с устойчивостью животных к заболеваниям [2]. Здоровые особи, как правило, не обладают одинаковой устойчивостью к инфекциям. Различия в показателях естественных антител у отдельных животных могут быть вызваны факторами окружающей среды (условия содержания, включая рацион питания, воздействие бактерий), а также эндогенными факторами, такими как генетический фон.

Известно, что в процессе иммунного ответа на экзoантиген уровень специфических антител повышается в течение 7...14 дней, а затем снижается. В результате проведенных исследований установлено, что концентрация tot-Ig, в состав которых входят и специфические антитела к антигенам вакцин против бешенства и сибирской язвы, к 9-м суткам иммунного ответа увеличилась в 2 раза, по сравнению с фоновыми значениями (см. табл.).

Однако концентрация NAb немного повысилась только на первые сутки иммунного ответа на вакцину против сибирской язвы. После введения инактивированной вакцины против бешенства на первые сутки иммунного ответа уровень NAb уменьшился в 2 раза, затем немного повысился, но до фоновых показателей так и не поднялся (см. рисунок). Показатели естественных антител после введения живой вакцины против сибирской язвы (штамм 55) на первые сутки иммунного ответа увеличились на 15 %, однако на 3-и сутки величина этого показателя уменьшилась на 50 %. Затем параметры NAb сывороток крови овец, иммунизированных вакциной против сибирской язвы, стали сравнимы с фоновыми значениями.



Динамика NAb в процессе поствакцинального иммунного ответа: ■ — бешенство; ■ — сибирская язва; ▲ — контроль.

Иммунная система состоит из огромного количества структурных компонентов, постоянно обменивающихся информацией для эффективной защиты организма. В этой связи следует отметить, что корреляции между иммунологическими показателями, определяемые как сильные устойчивые, показывают степень защитного ответа на поступающие чужеродные внешние сигналы [12].

В результате проведенных исследований установлено, что у животных в процессе поствакцинального иммунного ответа вне зависимости от введенной вакцины постоянно сохранялась отрицательная корреляция между числом лимфоцитов и нейтрофилов ( $r = -0,88 \pm 0,02$ ). Это конституционные константы, то есть обязательное условие нормального функционирования иммунной системы, изменение величины и направленности корреляционных пар нейтрофилов/лимфоциты (Нф/Лф) свидетельствуют о нарушении иммунорегуляции в организме. Иммунизация не привела к уменьшению коэффициента корреляции Нф/Лф, по сравнению с контролем, что может служить критерием прогноза эффективности вакцинации. Так, введение вакцины против бешенства ( $r = -0,81$ ) и сибирской язвы ( $r = -0,95$ ) привело к увеличению константы Нф/Лф, по сравнению с контрольными значениями ( $r = -0,79$ ). В процессе поствакцинального иммунного ответа, как и в контроле ( $r = -0,48$ ), сохранялась отрицательная корреляция Нф/NAb ( $r = -0,52$ ;  $r = -0,76$ ), что указывает на несинхронность активации фагоцитов и синтеза естественных антител. С другой стороны, установлена корреляционная взаимосвязь Лф/NAb в процессе иммунного ответа на вакцину против бешенства ( $r = 0,5$ ) и сибирской язвы ( $r = 0,7$ ), при отсутствии такой связи в контроле ( $r = 0,16$ ), что свидетельствует о реакции естественных антител на чужеродный антиген.

Взаимосвязь между показателями естественных антител в сыворотке крови овец 1 и 2 группы была незначительной ( $r = 0,27$ ), а между общими иммуноглобулинами коэффициент корреляции составлял 0,58. Корреляции Лф/NAb ( $r = 0,7$ ) и Лф/tot-Ig ( $r = 0,8$ ) были выше в динамике иммунного ответа на вакцину против сибирской язвы, чем на вакцину против бешенства ( $r = 0,5$ ).

Это подтверждает различные пути антителообразования после вакцинации и согласуется с известными данными о приоритете гуморальной защиты при бактериальных инфекциях. По всей видимости, сывороточные NAb к KLN, которые включают изотипы М, G и А, могут отражать врожденную гуморальную иммунную компетентность, а также различные эффекторные функции антител. Дальнейшие исследования должны показать, является ли вариабельность показателей естественных антител прогностической для оценки уровня иммунокомпетентности организма.

**Выводы.** Синтез естественных антител увеличивался только в первые сутки иммунного ответа на живую вакцину, что показывает быструю реакцию NAb на этот антиген. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о ареактивности естественных антител в ответ на антигенную стимуляцию инактивированной вакциной. Положительные корреляции между показателями естественных антител, общих иммуноглобулинов и лимфоцитов ( $r = 0,8$ ), а также отрицательные функциональные взаимосвязи между параметрами нейтрофилов и лимфоцитов ( $r = -0,95$ ) в крови овец могут служить диагностическим ориентиром в оценке поствакцинального иммунного ответа. На основании результатов исследования можно констатировать, что уровень NAb и корреляционные константы (Нф/Лф) могут служить прогностическими параметрами для оценки состояния иммунной системы и механизмов формирования иммунного ответа при разработке новых вакцин.

**Литература.**

1. Зиганишина М.М., Бовин Н. В., Сухих Г. Т. Естественные антитела как ключевой элемент механизма поддерживающего гомеостаз в иммунной системе // *Иммунология*. 2013. № 5. С.277–282.
2. Cecchini S., Rufrano D., Caputo A. R. Natural antibodies and their relationship with total immunoglobulins and acquired antibody response in goat kid (*Capra hircus*, L. 1758) serum//*Vet. Immunol. Immunopathol.* 2019. Vol.211. P. 38–43. doi:10.1016/j.vetimm.2019.04.004.
3. Bovine natural antibodies in antibody-dependent bactericidal activity against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and risk of mastitis/S.E.C. van Altena, M. A. Peen, F.H. van der Linden, et al. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2016. Vol. 171. P. 21–27. doi:10.1016/j.vetimm.2016.01.009
4. Thompson-Crispi K. A., Miglior F., Mallard B. A. Genetic parameters for natural antibodies and associations with specific antibody and mastitis in Canadian Holsteins// *J. Dairy Sci.* 2013. Vol. 96. P. 3965–3972. doi:10.3168/jds.2012-5919
5. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры/ А. А. Лушова, Э. А. Жеремян, Е. А. Астахова и др. // *Иммунология*. 2019. № 40(6). С. 63–76. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16009
6. Мяжкова М. А., Морозова В. С., Петроченко С. Н. Роль естественных аутоантител в норме и при патологии// *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2016. № 1. С. 20–26. doi: 10.14427/jipai.2016.1.20
7. Gualandi C. Relation between redox potential and natural antibody levels in goat kid serum// *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2022. Vol. 254. P. 110517. doi: 10.1016/j.vetimm.2022.110517
8. Relationship between natural antibodies and postpartum uterine health in dairy cows/ V. S. Machado, M.L.S. Bicalho, R. O. Gilbert et al. // *J. Dairy Sci.* 2014. Vol. 97. P. 7674–7678. doi:10.3168/jds.2014-8393.
9. Effects of dry period length and dietary energy source on inflammatory biomarkers and oxidative stress in dairy cows/ N. Mayasari, J. Chen, A. Ferrari et al.// *J. Dairy Sci.* 2017. Vol. 100. P. 4961–4975. doi:10.3168/jds.2016-11857.
10. Ассоциации между показателями уровня IgG быков-производителей и естественного иммунитета их дочерей/ И. Ю. Ездакова, А. М. Гулюкин, М. А. Еремина и др.// *Российская сельскохозяйственная наука*. 2021. № 2. С. 68–72. doi: 10.31857/S2500262721020149
11. Еремина М. А., Ездакова И. Ю. Динамика естественных антител у коров в зависимости от срока стельности и происхождения// *Молочное и мясное скотоводство*. 2017. № 2. С. 34–36.
12. Отрицательная корреляция между естественными антителами человека, направленными к гликогенам Galβ1–3GlcNAc и Galβ1–4GlcNAc/ Н. В. Шилова, И. М. Рыжов, М. М. Зиганишина и др.// *Биоорганическая химия*. 2020. 46. № 6. С. 746–752. doi: 10.31857/S0132342320060299

**Поступила в редакцию 27.04.2023**

**После доработки 20.06.2023**

**Принята к публикации 22.08.2023**