

На правах рукописи

**ПОЛОВИНКИНА
Валерия Сергеевна**

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
ОРГАНИЗМА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИСКУССТВЕННОГО
АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА НА ПРИМЕРЕ *YERSINIA PESTIS*
(экспериментальное исследование)**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2018

Работа выполнена в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора).

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Дубровина Валентина Ивановна

Научный консультант:

доктор биологических наук

Марков Евгений Юрьевич

Официальные оппоненты:

Семинский Игорь Жанович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической физиологии с курсом клинической иммунологии, заведующий

Бодиенкова Галина Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», лаборатория иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене, заведующая

Ведущая организация: Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.038.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» и на сайте www.health-family.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Гребенкина Людмила Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Чума – особо опасное природно-очаговое инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Yersinia pestis*. Наличие активных природных очагов чумы на территории Российской Федерации, неоднократный завоз из стран Юго-Восточной Азии этой инфекции, а также потенциальная возможность применения её возбудителя в качестве агента биотерроризма обуславливают необходимость разработки надёжных средств специфической профилактики (Анисимов А. П., 2002; Williamson E. D., Oyston P. C., 2013; Verma S. K., Tuteja U., 2016 и др.). На сегодняшний день с этой целью в мире применяется ряд отечественных и зарубежных лицензированных противочумных вакцин (Бывалов А. А., Кутырев В. В., 2011; Smiley S. T., 2008; Pakharukova N. et al., 2016 и др.). Тем не менее, проблема специфической профилактики чумы по-прежнему актуальна, поскольку существующие вакцины далеки от совершенства (Wang X. et al., 2013; Martínez-Chavarría L. C., 2016 и др.). Так, в число их недостатков входят: формирование непродолжительного иммунитета; отсутствие гарантированной защиты от заболевания лёгочной чумой; реактогенность и возможная утрата иммуногенности при хранении живых вакцин. Кроме того, большинство аттенуированных живых вакцин непригодны для применения в условиях проведения экстренной профилактики чумы антибиотиками (Микшис Н. И. и др., 2015; Дерябин П. Н. и др., 2016; Саяпина Л. В. и др., 2016; Smiley S. T., 2008 и др.). Все перечисленные недостатки служат основанием для конструирования новых вакцин и повышения их эффективности за счёт использования адъювантных препаратов (Arnon R., Ben-Yedidia T., 2003; Zhu M. et al., 2014; Iwasaki A., Medzhitov R., 2015; Yang R., Anisimov A., 2016 и др.).

Степень разработанности темы исследования

Одним из перспективных направлений исследований повышения резистентности организма к чуме является разработка химических вакцин на основе протективных антигенов *Y. pestis*, таких, как фракция I (F1), LcrV (V антиген) (Williamson E. D. et al., 2011), липополисахарид (ЛПС), основной соматический антиген (ОСА) (Голубинский Е. П. и др., 1984; Бывалов А. А., Оводов Ю. С., 2011; Titball R. W. et al., 1997; Wolf J. J. et al., 2010). Однако очищенные или синтезированные антигены и антигенные детерминанты, взятые отдельно, как правило, не способны индуцировать выраженный иммунный ответ (Ellis T. N., Kuehn M. J., 2010; Feodorova V. A. et al., 2014). В качестве основы химических бесклеточных вакцин и универсальной системы целенаправленной доставки антигенов могут рассматриваться нативные поверхностные структуры, такие, как клеточная стенка, полые везикулы из наружной мембраны или «теней» грамотрицательных бактерий, обладающие иммуномодулирующими свойствами и являющиеся носителями дополнительных антигенных детерминант (Mayr U. B. et al., 2005; Lubitz P. et al., 2009; Kudela P. et al., 2010; Langemann T. et al., 2010).

С учётом этого комплексирование изолированных антигенов с клеточной стенкой чумного микроба, содержащей важный антигенный материал (белки наружной мембраны, ЛПС, ОСА, пептидогликан и т.п.), позволяет усилить их протективную активность (Голубинский Е. П. и др., 1984; Марков Е.Ю. и др., 1998; Авророва И. В. и др., 2010; Микшис Н. И. и др., 2015; Toth I. et al., 2014).

Кроме того, для повышения эффективности химических вакцин применяют адъюванты – синтетические и природные биополимеры, обладающие иммуномодулирующим действием (Атауллаханов Р. И., Хаитов Р. М., 2011; Авдеева Ж. И. и др., 2015; Rizza P. et al., 2002; Ebensen T., Guzman C. A., 2008).

В настоящее время установлено, что бактериальная ДНК (бДНК) является патоген-ассоциированной молекулярной структурой (pathogen associate molecular patterns, PAMPs)

(Vollmer J., Krieg A. M., 2009; Samulowitz U. et al., 2010; Jensen K. M. et al., 2012), обладающей адьювантными свойствами, которые способствуют иницированию каскада реакций, приводящих к синтезу провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками и активации механизмов иммунологической защиты организма (Колесникова И. Г. и др., 2016; Tross D., Klinman D. M., 2008; Tomai M. A., Vasilakos J. P., 2011; Hickey A. J. et al., 2013).

Перспективным синтетическим адьювантом, также входящим в число РAMPs, является мурамилдипептид (N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин, МДП) (Милютина Л. Н., Голубев А. О., 2015; Колесникова Н. В., Андропова Т. М., 2016; Мещерякова Е. А. и др., 2016).

Таким образом, исследование пригодности различных антигенов и субклеточных фракций *Y. pestis*, подбор адьювантов и создание искусственных антигенных комплексов, обеспечивающих целенаправленное действие последних на иммунную систему организма человека и животных, могут явиться основой получения высокоиммуногенных препаратов, что определяет актуальность для практического здравоохранения в области разработки эффективных и слабо реактогенных химических вакцин против чумы (Никитина Т. Н., Авдеева Ж. И., 2008; Бугоркова С. А. и др., 2013; Микшис Н. И. и др., 2015; Kenney R. T., Edelman R., 2003; Suwanti S. et al., 2013).

Цель исследования: выявить механизмы формирования резистентности организма животных к *Y. pestis* под действием искусственно созданных антигенных комплексов на основе клеточных оболочек (КО) и F1 чумного микроба в сочетании с адьювантами.

Для реализации поставленной цели последовательно решались следующие **основные задачи:**

1. Охарактеризовать физико-химические и иммунохимические свойства клеточных оболочек, F1 чумного микроба, полученных «щадящим» способом обработки микробной массы.
2. Установить протективную активность субклеточных фракций, адьювантов и искусственного антигенного комплекса.
3. Оценить влияние искусственного антигенного комплекса в сочетании с адьювантами на состояние кислородзависимого, нитроксидзависимого и кислоронезависимого метаболизма клеток фагоцитарной системы белых мышей в условиях *in vitro*.
4. Выявить закономерности изменения продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками белых мышей под действием субклеточных фракций чумного микроба.
5. Определить влияние различных субклеточных фракций чумного микроба и адьювантов на функциональное состояние и субпопуляционный состав клеток крови белых мышей.
6. Патогенетически обосновать возможность создания искусственного антигенного комплекса в сочетании с адьювантами для повышения резистентности организма экспериментальных животных в отношении *Y. pestis*.

Научная новизна работы

Приоритетными являются данные стимулирующего влияния препаратов КО + F1, КО + F1 + ДНК и КО + F1 + МДП на активность кислородзависимого метаболизма лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов экспериментальных животных.

Экспериментально показано, что иммунный ответ, степень активации лимфоцитов, а также апоптоз иммунокомпетентных клеток лабораторных животных в ответ на введение искусственных антигенных комплексов на основе клеточных оболочек и очищенных протективных антигенов чумного микроба в сочетании с адьювантами зависят от сроков наблюдения.

Установлено, что повышение содержания незрелых популяций Т-лимфоцитов ($CD3^+CD4^-CD8^-$, $CD3^+CD4^+CD8^+$), а также наличие корреляционных связей этих клеток с активированными Т-лимфоцитами и моноцитами свидетельствуют об участии препаратов в формировании реакций адаптивного иммунитета.

Новыми являются сведения о стимулирующем действии комплексного препарата на основе F1-антигена и клеточных оболочек в сочетании с тДНК чумного микроба или МДП

на активацию сигнальных путей синтеза провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-12 (p40), IL-18, IL-12 (p70), TNF- α , IFN- γ), факторов, стимулирующих рост лимфоцитов (IL-2), пролиферацию и дифференцировку клеток (M-CSF, GM-CSF), переключение синтеза классов антител (IL-4, IL-5), а также факторы роста (фактор роста тромбоцитов PDGF-BB, фактор роста эндотелия сосудов VEGF), MIG – монокин, индуцируемый IFN- γ , противовоспалительный цитокин IL-10.

Получены новые данные о способности комплексного препарата на основе F1-антигена и КО чумного микроба как *per se*, так и в сочетании с тДНК или МДП оказывать стимулирующее влияние на продукцию цитокинов и GM-CSF и пролиферацию предшественников тканевых макрофагов и гранулоцитов.

Предложена и патогенетически обоснована концептуальная схема механизмов действия искусственного антигенного комплекса на основе КО и F1 антигена чумного микроба и в сочетании с МДП и тДНК на функциональное состояние клеток иммунной системы.

Показано, что комплексный препарат, включающий клеточные оболочки и F1-антиген *Y. pestis*, обладает протективной активностью для белых мышей, в том числе на фоне неспецифической профилактики доксициклином. МДП и тДНК возбудителя чумы повышают иммунологическую эффективность комплексного препарата, что указывает на перспективность использования этих иммуномодуляторов в качестве адъювантов при конструировании химических вакцин против чумы.

Теоретическое и практическое значение работы

Разработан новый способ получения иммуногенного препарата *Y. pestis*, заключающийся в подборе оптимальных условий обработки клеток чумного микроба и одномоментном получении F1-антигена и КО (патент на изобретение RUS 2248217 «Способ получения иммуногенного препарата из *Yersinia pestis* EV»). Сконструирован искусственный антигенный комплекс на основе КО и F1 антигена *Y. pestis*.

Показана роль искусственных антигенных комплексов на основе КО и F1 антигена чумного микроба в сочетании с МДП и тДНК в реализации бактерицидных механизмов фагоцитоза (кислород-, нитроксидзависимых и кислороднезависимых) клеток иммунофагоцитарной системы.

Получены новые данные о функциональных изменениях, происходящих в клетках организма при иммунизации экспериментальных животных искусственным антигенным комплексом на основе КО и F1 антигена чумного микроба в сочетании с адъювантами (тДНК или МДП), которые дополняют теоретические знания и определяют направления изысканий в области изучения механизмов формирования резистентности макроорганизма к чуме.

Показана возможность применения искусственного антигенного комплекса на основе клеточных оболочек и F1-антигена чумного микроба в сочетании с адъювантами для повышения резистентности организма экспериментальных животных в отношении *Y. pestis*.

Результаты исследования изложены в монографии «Иммуномодулирующее действие металлосодержащих наноконструктов» (Иркутск, 2017).

Научные и практически значимые материалы диссертационных исследований включены в лекционные курсы дополнительного послевузовского образования при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Методология и методы исследования

В работе использованы научные методы исследования (микробиологические, биологические, биохимические, иммуноцитометрические и статистические). Микробиологические методы применяли при получении бактериальной массы, определении LD₅₀, защитных свойств полученных препаратов. Биологическим методом проводили определение токсичности экспериментальных препаратов. Биохимические методы включали определение бактерицидных механизмов фагоцитов экспериментальных животных. Иммуноцитометрическими методами определяли функциональную способность клеток

крови экспериментальных животных. Все полученные материалы обработаны статистически стандартными методами.

Положения исследования, выносимые на защиту

1. Функциональная способность фагоцитов, примированных антигенным препаратом на основе КО и F1 чумного микроба, проявляется в повышении степени активации эффекторных функций клеток иммунофагоцитарной системы (микробицидность, продукция супероксидных и нитроксидных радикалов), которая модулируется за счёт применения тДНК *Y. pestis* EV НИИЭГ и МДП.

2. Антигенные комплексы на основе КО и F1 антигена чумного микроба в сочетании с адьювантами (тДНК *Y. pestis* EV НИИЭГ и МДП) являются индукторами иммунного ответа. Изменения субпопуляционного состава и образование апоптотических клеток крови белых мышей, иммунизированных этими препаратами, зависят от сроков взаимодействия антигена с клетками макроорганизма.

3. Антигенный препарат (КО и F1 чумного микроба и) в сочетании с тДНК *Y. pestis* и мурамилдипептидом способствует формированию адаптивного иммунного ответа и повышению резистентности организма к чуме.

Степень достоверности результатов и апробация работы

О достоверности результатов работы свидетельствует достаточный объем исследований с применением современных высокочувствительных и специфичных методов с автоматизированным учётом и оценкой результатов и соответствующих методов статистической обработки полученных данных.

Материалы, изложенные в диссертации, обсуждены и представлены на: международных научных конференциях «Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний» (Новосибирск, 2004), «Природно-очаговые инфекции» (Улан-Батор, 2005–2012), IX съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2007); всероссийских научных конференциях «Противочумные учреждения России и их роль в обеспечении эпидемического благополучия населения страны» (Москва, 2004), «Медицинская микробиология – XXI век» (2004, Саратов), «Инфекции, обусловленные иерсиниями» (Санкт-Петербург, 2006), «Современные аспекты эпидемиологического надзора и профилактики особо опасных инфекций» (Иркутск, 2009); региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии» с международным участием (Иркутск, 2012); конференциях молодых учёных и специалистов «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболensk, 2010), «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» (Санкт-Петербург, 2014); научных конференциях Иркутского научно-исследовательского противочумного института (Иркутск, 2004–2016).

Публикации

По теме диссертации опубликованы 20 научных работ, в том числе 6 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 2 – в иностранных журналах, издана монография и получен патент на изобретение.

В основу диссертационной работы положены исследования, проведённые в рамках двух тем НИР института: «Получение антигенных комплексов на основе изолированных мембранных структур чумного микроба, пригодных для специфической профилактики чумы» с № ГР 01.20 0013858 (2001–2005 гг.) и результатов темы 7.10; «Изучение иммуномодулирующего действия нанобиоконструкций природного происхождения для повышения неспецифической резистентности макроорганизма», выполненной в рамках Отраслевой программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (2011–2015 гг.).

Личный вклад соискателя

Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментов, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и докладах.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованных литературных источников. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, иллюстрирована 10 таблицами и 11 рисунками. Список литературы содержит 298 наименований, в том числе 73 отечественных и 215 – зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальными моделями в основных опытах (иммунизация, заражение, отбор проб крови, получение фагоцитов и т. д.) служили сертифицированные животные (НПО «Вектор», Новосибирск РД 42-26-3...3738) – морские свинки (масса 250–300 г) и беспородные белые мыши (масса 18–20 г). Всего в опытах использовано 2921 животное: 97 морских свинок, 2824 белых мышей. Работа проводилась в соответствии с Приказом МЗ СССР № 755 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (1977 г.) и Приложением к Приказу № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (2003 г.). Количество животных для опыта подбирали с учётом получения статистически значимых результатов. Эксперименты проводили в 2–3 повторах. В качестве контроля использовали клетки интактных животных.

Объектом исследования служили антигенные препараты КО, FI и их комплексы как *per se* (КО + FI), так и в сочетании с адьювантами.

Принимая во внимание способность возбудителя чумы подавлять реакцию врождённого иммунитета, для повышения эффективности комплексных препаратов в опытах *in vitro* и *in vivo* исследовали действие адьювантов, обладающих иммуномодулирующим действием: препарат суммарной ДНК вакцинного штамма *Y. pestis*, мурамилдипептид (МДП) – N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine («Calbiochem»), арабиногалактан (АГ) из лиственницы сибирской (Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского).

Определение токсичности адьювантов проводили на белых мышах и морских свинках при подкожном введении в дозе от 100 мкг/кг до 100 мг/кг.

При изучении фагоцитарной активности клеток системы мононуклеарных фагоцитов использовали пережившую однослойную культуру (Фрейдлин И.С., 1984, 1986) перитонеальных макрофагов (ПМ) и полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ). К суспензии клеток концентрацией 2×10^7 /мл вносили исследуемое вещество в диапазоне от 2,5 до 250 мкг/мл и инкубировали в течение 60 мин при 37 ± 1 °С. Активность миелопероксидазы (МПО, КФ 1.11.1.7) и содержание неферментных катионных белков (НКБ) определяли по методу Л.М. Сомовой (2005), NO-синтазы (КФ 1.14.13.39) по методу L.C. Green с соавт. (1994) в модификации (Дубровина В.И. и др., 2008). Активность НАДФ·Н-диафоразы (КФ 1.6.99.1), которая является специфическим маркером NO-синтазы, определяли, основываясь на методах В.Т. Норе, S.R. Vinsent (1989) в модификации (Коновалова Ж.А. и др., 2011). Для оценки интенсивности образования в индуцированных клетках метаболитов кислорода использовали тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) (Park V.H. et al., 1968).

Результаты реакций учитывали на автоматическом 8-канальном ридере для 96 луночных микропланшет и стрипов BIO-TEK INSTRUMENTS INC (США) по унифицированному способу и выражали в виде индекса стимуляции фагоцитов (ИС),

который вычисляли как соотношение величин оптической плотности в опытной и контрольной пробах и выражали в процентах.

Анализ содержания цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-15, IL-18, M-CSF, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , VEGF, Basic FGF, LIF, PDGF-BB, MIP-2, MIG в плазме крови оценивали на 3-и, 7-е и 21-е сутки после инокуляции животным исследуемых препаратов методом проточной флюориметрии на двулучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex 200 System, Bio-Rad, США). В работе использовали следующие коммерческие тест-системы: Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Standard Group I 23-Plex, Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Standard Group II 9-Plex. Обработку данных проводили с помощью программы Bio-Plex Manager 5.0 (Bio-Rad). Концентрацию цитокинов в плазме крови выражали в пкг/мл.

Анализ субпопуляционного состава клеток крови экспериментальных животных проводили методом проточной цитометрии на приборе BD FACSCanto™ II в программе BD Diva 6.0, собирая 100 000 событий для каждой пробы. Для изучения клеточного звена иммунной системы определяли следующие субпопуляции Т-лимфоцитов: общее содержание активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺), общее содержание активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD25⁺), популяции активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD25^{low} и CD3⁺CD4⁺CD25^{high}), активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD25⁺), нативные Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD25⁻), нативные цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD25⁻). В рамках циркулирующей популяции В-лимфоцитов оценивали содержание клеточных линий: CD38⁻CD138⁻, CD38⁺CD138⁻, CD38⁻CD138⁺, CD38⁺CD138⁺. Индекс содержания (Ис) рассчитывали как соотношение величин клеток в опытной и контрольной пробах и выражали в процентах.

Все полученные материалы обработаны статистически стандартными методами с применением пакета программ Statistica, версия 6.1 (StatSoft Inc., 19842001, ИПЧИ 31415926535897) и пакета программ Microsoft Excel 2003 (Microsoft). Статистическую обработку данных проводили с учётом типа распределения, числа и связности групп. Для переменных, имеющих распределение, близкое к нормальному, применяли критерии параметрической статистики Стьюдента, Фишера, Левена ANOVA, в противном случае – непараметрические (Манна – Уитни, Вилкоксона, Крускала – Уоллиса), корреляционный анализ проведён методом ранговой корреляции Спирмена (r_s). Проблему Беренса – Фишера решали методами дисперсионного анализа или по непараметрическим критериям. Deskриптивные характеристики изучаемых величин представлены в виде среднего арифметического (Mean) \pm среднего квадратичного отклонения (SD) или медианы (Me) с интерквартильными размахами (Q₂₅–Q₇₅). Все различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение субклеточных фракций и антигенов возбудителя чумы, изучение их физико-химических и иммунохимических свойств

Для получения антигенного препарата с максимальным сохранением иммуногенных свойств была изучена возможность обеззараживания бактериальной массы *Y. pestis* EV растворами мочевины и цетавлона (цетилтриметиламмоний бромид). Для усиления бактерицидного воздействия раствора мочевины испытаны добавки в виде 1%-го саркозината натрия или 1%-й уксусной кислоты.

В ходе исследования получен антигенный комплекс на основе извлекаемых с помощью мочевины и цетавлона КО чумного микроба и F1, который был сконструирован как за счёт механического смешивания (в соотношении 1:1 по сухому весу), так и путём химического конъюгирования с использованием глутарового альдегида, а также сорбции на частицах коллоидного золота.

Препараты КО и F1 в дозе до 1000 мкг, а также ДНК чумного микроба в дозах 15,625–250 мкг не токсичны для лабораторных животных.

Анализ химического состава препаратов F1 показал содержание в нём свыше 90 % белка, 3 % углеводов, менее 1 % нуклеиновых кислот.

Электрофоретический анализ показал наличие во всех полученных препаратах F1 мажорного полипептида с молекулярной массой 17 кДа. Однако препарат, выделенный из цетавлонового экстракта, в отличие от антигенов мочевинных экстрактов, обладал большей гетерогенностью и содержал несколько полипептидов с молекулярными массами от 29 до 92 кДа.

Исследование химического состава препарата КО показало, что содержание белка в нём составило не менее 55,5 %, нуклеиновых кислот – 0,4 %, эквивалентов глюкозы – 2 %, 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты – 0,6 %, мурамовой кислоты – 0,9 %.

Электрофоретический анализ препаратов КО *Y. pestis* EV показал наличие большого количества полипептидов с молекулярными массами от 13 до 100 кДа (и несколько выше), а также ЛПС (R-форма).

Лиофилизированный препарат суммарной ДНК *Y. pestis* EV хорошо растворим в воде и водных растворах, содержание белка в препарате ДНК не превышает 0,6 %. Электрофоретический анализ препарата ДНК в агарозном геле выявил одну высокомолекулярную полосу, что свидетельствует о гомогенности препарата.

При исследовании иммунохимической активности и специфичности препаратов с помощью иммуноблотинга показано наличие капсульного антигена в полученных препаратах F1. Мажорный полипептид с молекулярной массой 17 кДа является иммунодоминантным компонентом данных препаратов. Дополнительная полоса с молекулярной массой 34 кДа, проявляющаяся на реплике, по-видимому, соответствует димеру капсульного антигена.

Реакция с кроличьей чумной антифракционной сывороткой показала, что полученные препараты содержали в своём составе капсульный антиген F1. В реакции иммунодиффузии с кроличьей поливалентной чумной антисывороткой препараты F1 также давали по одной линии преципитации, что указывало на присутствие в них антигена F1.

Таким образом, с помощью физико-химических и иммунохимических методов (УФ-спектроскопия, иммуноблотинг, дот-иммуноанализ, РИД, ИФА и РПГА) показана чистота и специфичность препаратов КО, F1 и тДНК, полученных «щадящим» способом обработки микробной массы.

Установление саногенетических механизмов протективной активности искусственного антигенного комплекса *Y. pestis* EV и в сочетании с адьювантами

Показано, что из всех полученных субклеточных фракций клеток *Y. pestis* выраженной протективной активностью обладали препараты, полученные обработкой 0,0625%-м раствором цетавлона (с последующей обработкой ДОХ) выращенные при 37 °С – КО (препарат 8) и F1 (препарат 4) ($ImD_{50} = 11$ мкг и $ImD_{50} = 21$ мкг соответственно). Введение достаточно высоких доз данных препаратов (31,25–1000 мкг) защищало 100 % взятых в опыт беспородных белых мышей от последующего заражения вирулентным штаммом *Y. pestis*.

Полученные из указанных препаратов КО и F1 искусственные антигенные комплексы чумного микроба также проявляли выраженную иммуногенность в тесте защиты белых мышей ($ImD_{50} = 11$ мкг). Конъюгированный, приготовленный с использованием глутарового альдегида препарат F1 и необработанных ДОХ КО (в дозе по 250 мкг каждого компонента) также защищал 100 % взятых в опыт мышей от последующего заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* И-2683 (в дозе 200 LD₅₀). Сорбция КО и F1 на частицах коллоидного золота не оказывала статистически значимого воздействия на протективную активность субклеточных фракций чумного микроба.

При изучении протективной активности комплексов КО и F1 *Y. pestis* EV (однократное парентеральное введение в тесте защиты белых мышей при заражении их через

21 сутки после иммунизации культурой *Y. pestis* И-2683 в дозе 200 LD₅₀) показано, что введение КО, конъюгированных с капсульным антигеном чумного микроба, защищает 100 % взятых в опыт белых мышей от последующего заражения вирулентным штаммом *Y. pestis*. Препарат КО с F1, полученный простым механическим смешиванием, защищал 80 % взятых в эксперимент лабораторных животных.

Смесь антигенов чумного микроба с МДП обладала наибольшей протективной активностью независимо от иммунизирующей дозы. После заражения вирулентным штаммом выжили все взятые в опыт животные (Таблица 1).

Таблица 1 – Протективная активность комплекса клеточных оболочек и F1 *Y. pestis* EV в сочетании с иммуномодуляторами

Препарат	Доза, мкг	Иммуномодулятор	Доза, мг	Количество животных			ImD ₅₀ , мкг
				в опыте	выжило	пало	
КО	125	–	–	4	4	0	11
	62,5			5	5	0	
	31,3			5	5	0	
	15,6			5	3	2	
	7,8			5	2	3	
F1	125	–	–	1	1	0	19,9
	62,5			3	2	1	
	31,3			5	5	0	
	15,6			2	1	1	
КО + F1	62,5	–	–	4	4	0	9,4
	31,25			4	3	1	
	15,6			5	4	1	
	7,8			2	1	1	
КО + F1	62,5	АГ	4	5	5	0	8,9
	31,25			4	4	0	
	15,6			5	3	2	
	7,8			5	4	1	
КО + F1	62,5	МДП	0,01	3	3	0	5,6
	31,25			5	5	0	
	15,6			4	3	0	
	7,8			5	5	0	
КО + F1	62,5	ДНК	0,01	5	5	0	6,4
	31,25			5	4	1	
	15,6			4	4	0	
	7,8			5	5	0	
<i>Y. pestis</i> EV	10 ⁷ м. к.	–	–	5	5	0	7943,3 м. к.
	10 ⁶ м. к.			5	5	0	
	10 ⁵ м. к.			5	5	0	
	10 ⁴ м. к.			5	3	2	
ДНК	–	–	0,01	10	0	10	
Контроль		–	–	10	0	10	

Показано, что комплексный препарат КО + F1 в сочетании с синтетическим МДП и суммарной ДНК *Y. pestis* EV, обеспечивает резистентность к чуме, о чём свидетельствует 100%-я выживаемость (при оптимальных иммунизирующих дозах) заражённых животных.

В ходе исследования было установлено, что прижизненная обработка клеток чумного микроба растворами мочевины и цетилтриметиламмония бромида в подобранных условиях обладает мощным бактерицидным действием и позволяет получать иммуногенные субклеточные фракции чумного микроба. Это подтверждает перспективность идеи

выделения антигенов непосредственно из живых, а не из убитых традиционными методами микробных клеток.

Таким образом, введение одного антигенного комплекса в день заражения защищает от гибели 40 % взятых экспериментальных животных, а на фоне проведения экстренной неспецифической профилактики (введение доксицилина в дозе 0,2 мг) в течение 6 суток наблюдается повышение выживаемости белых мышей до 90 %. Иммунизация животных смесью антигенного комплекса с ДНК позволяет сократить срок экстренной антибиотикотерапии до трёх суток.

Анализ результатов эксперимента показал, что эффективность одного антигенного комплекса и в смеси с иммуностимуляторами на фоне введения антибиотика возрастала в зависимости от сроков иммунизации. Также показано, что применение доксицилина не снижает защитных свойств комплексного препарата как самого по себе, так и в сочетании с модуляторами.

Таким образом, создаваемый комплексным вакцинирующим препаратом в сочетании с синтетическим МДП или с суммарной ДНК *Y. pestis* EV активный иммунитет обеспечивает резистентность к чумному микробу, о чём свидетельствует выживаемость (при оптимальных иммунизирующих дозах) всех зараженных животных. МДП и препарат суммарной ДНК *Y. pestis* увеличивают иммунологическую эффективность субклеточных фракций чумного микроба.

Функциональное состояние бактерицидных систем фагоцитов *in vitro* под действием искусственных антигенных комплексов чумного микроба в сочетании с адьювантами

Установлено, что экспериментальный препарат КО + F1 в сочетании с адьювантами (ДНК, МДП) оказывает стимулирующее влияние на активность NO-синтазы (NOS) как лейкоцитов крови, так и клеток системы мононуклеарных фагоцитов белых мышей (Рисунок 1).

Значения индекса стимуляции продукции NO фагоцитами, обработанными комплексом антигенных детерминант в сочетании с адьювантами, были положительными.

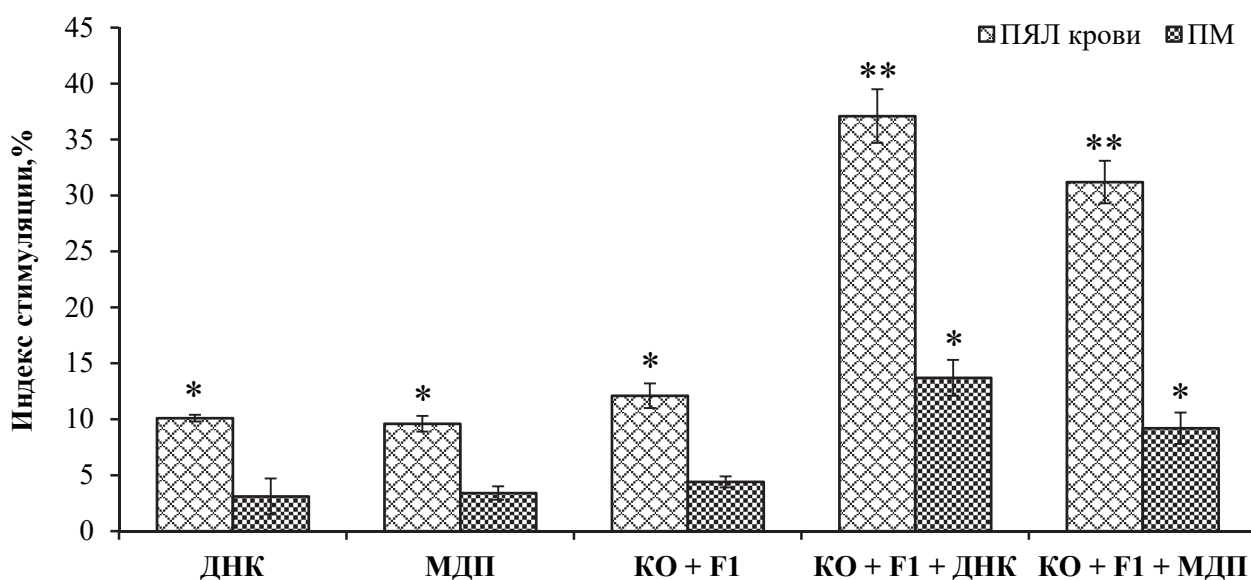


Рисунок 1 – Активность NOS фагоцитов: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,001$

Полученные нами препараты оказывали различное стимулирующее воздействие на активность NO-синтазы. Так, самые высокие уровни продукции NO² зарегистрированы у клеток иммунофагоцитарной системы, обработанных КО + F1 + ДНК ($37,1 \pm 2,4$) и

КО + F1 + МДП ($31,2 \pm 1,9$). Между фагоцитами обеих клеточных популяций, обработанных по отдельности: КО + F1, ДНК, МДП, – статистически значимых различий выявлено не было. Также установлено, что в лейкоцитах, стимулированных экспериментальными препаратами, образование NO^2 происходит интенсивнее в среднем в 3,0 раза, чем в перитонеальных макрофагах ($P \leq 0,05$).

Как показали результаты определения активности кислороднезависимого метаболизма гранулоцитов, полученные нами экспериментальные препараты оказывают стимулирующее воздействие на содержание неферментных катионных белков в фагоцитах.

Адьюванты (ДНК, МДП), использованные нами в эксперименте, усиливали стимулирующее воздействие комплексного препарата (КО + F1), повышали уровень содержания НКБ в лейкоцитах крови экспериментальных животных, что выражалось в более высоких показателях ИС, по сравнению с клетками, обработанными только комплексным препаратом или иммуностимуляторами по отдельности. Важно отметить, что КО + F1 в сочетании с бактериальной ДНК ($14,04 \pm 0,14$) обладают наибольшим стимулирующим эффектом.

Установлено, что у фагоцитов, инкубированных с КО + F1 + ДНК, зарегистрированы максимальные значения НСТ-теста, которые статистически значимо ($P \leq 0,05$) превышали аналогичные показатели у фагоцитов, инкубированных по отдельности с КО + F1, МДП и ДНК в 2,7; 3,8 и 3,4 раза соответственно (Рисунок 2).

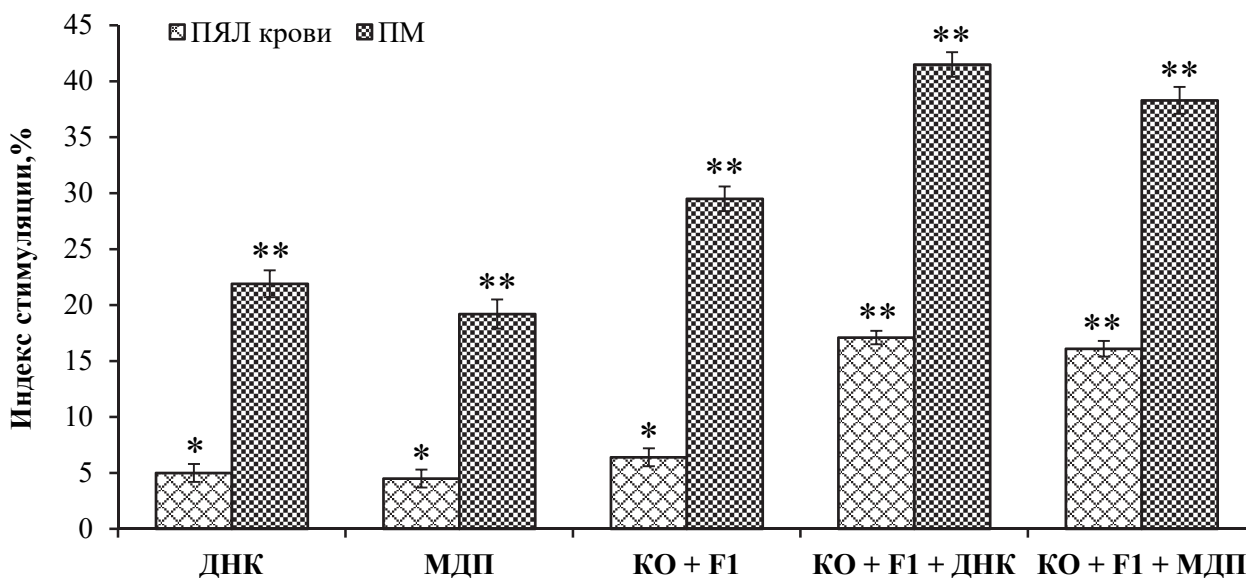


Рисунок 2 – Активность кислородзависимого метаболизма (НСТ-тест): * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,001$

После воздействия субклеточных фракций чумного микроба уровень продукции активных кислородных радикалов перитонеальными макрофагами был в 2,4–4,6 раза выше ($P \leq 0,05$).

Результаты определения активности кислороднезависимого метаболизма гранулоцитов под воздействием субклеточных фракций чумного микроба также демонстрируют стимулирующее влияние экспериментальных препаратов на содержание неферментных катионных белков в фагоцитах с 5,6 % до 14,1 %. Кроме того, наглядно представлено *in vitro* стимулирующее влияние адьювантов (тДНК, МДП) и самого комплекса антигенных детерминант чумного микроба (КО + F1) на активность кислородзависимого метаболизма лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов экспериментальных животных с 4,5 % до 41,5 %.

Таким образом, на основании проведённых исследований показана роль искусственных антигенных комплексов на основе клеточных мембран и F1 чумного микроба

в сочетании с адьювантами в реализации бактерицидных механизмов фагоцитоза (кислород- и нитроксидзависимых, кислороднезависимых) клеток иммунофагоцитарной системы.

Продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками белых мышей под действием субклеточных фракций чумного микроба

Установлено, что уровень цитокинов в сыворотке крови мышей контрольных групп К1 и К2 статистически значимо не различался. Не наблюдалось также статистически значимых различий в уровне цитокинов IL-1 α , MIP-2, LIF, Basic FGF, IL-15 в сыворотках крови мышей контрольных и опытных групп.

Стоит отметить также, что уровни цитокинов GM-CSF и IL-12 (p70) статистически значимо увеличивались после инокуляции всех перечисленных выше экспериментальных препаратов (Рисунок 3).

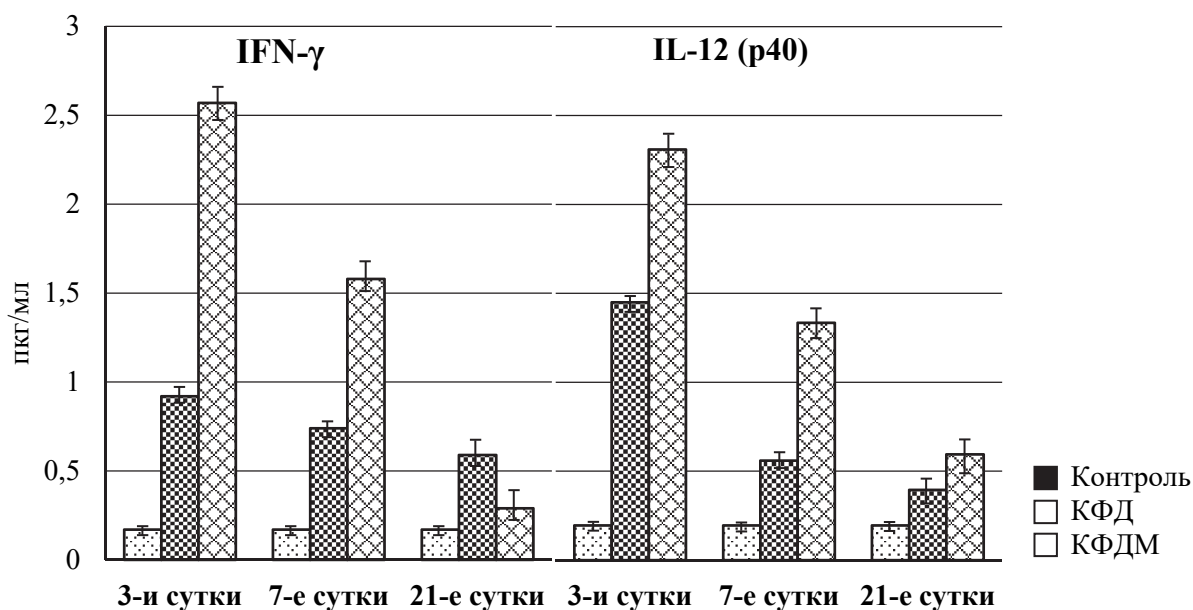


Рисунок 3 – Влияние антигенных комплексов чумного микроба на активацию транскрипционного фактора STAT 4

Полученные в ходе эксперимента результаты свидетельствуют о стимулирующем эффекте всех исследованных препаратов на продукцию цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-18, TNF- α , IFN- γ , M-CSF, GM-CSF, PDGF-BB, VEGF, MIG.

Таким образом, можно предположить, что комплексный препарат на основе F1-антигена и клеточных оболочек вакцинного штамма EV в сочетании с адьювантами (тДНК чумного микроба, МДП) стимулирует рецепторы TLR2, NLR2, TLR9 и TLR4, которые являются активаторами сигнальных путей синтеза цитокинов (Kawai T., 2009; Jensen K.M. et al., 2009; Vollmer J., Krieg A.M., 2009). Кроме того, экспериментальный препарат в сочетании с адьювантами оказывает разнонаправленный иммуномодулирующий эффект на клетки макроорганизма, что выражается сбалансированной продукцией про- и противовоспалительных цитокинов. Наибольшие показатели активации продукции провоспалительных цитокинов установлены на 3-и сутки. Антигенный комплекс КС + F1, ДНК и МДП на 3-и и 7-е сутки развития иммунного ответа обладает более выраженным стимулирующим действием на продукцию IFN- γ и IL-12 (p40), по сравнению с КС + F1, ДНК. В свою очередь начало выработки противовоспалительного цитокина IL-10 на 7-е сутки препятствует чрезмерному росту показателей воспалительного процесса, вызванного продукцией провоспалительных цитокинов.

Субпопуляционный состав лимфоцитов крови белых мышей под действием субклеточных фракций чумного микроба

Установлено статистически значимое повышение как абсолютного, так и относительного содержания нейтрофильных гранулоцитов у экспериментальных животных первой и второй групп. В случае мышей, получивших препарат F1 + КО + МДП, выявлено увеличение числа циркулирующих нейтрофилов (на 3-и и 14-е сутки). Стоит отметить, что наиболее выраженные изменения содержания этих клеток имеют место у мышей, иммунизированных препаратом F1 + КО. Анализ динамики субпопуляционного состава лимфоцитов крови мышей, иммунизированных F1 + КО + тДНК и F1 + КО + МДП, показал увеличение относительного числа Т-лимфоцитов (на 3-и, 7-е и 21-е сутки), а также существенное перераспределение Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако в случае применения тДНК имело место увеличение показателей относительного содержания CD8⁺-лимфоцитов во все сроки наблюдения, в то время как у мышей третьей группы – на 3-и и 7-е сутки. Препарат тДНК, а также МДП способствует увеличению относительного содержания Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) (на 7-е и 21-е сутки). Следует отметить, что у мышей группы 3 на 14-е сутки наблюдалось значительное увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов и их субпопуляций ($P < 0,01$) без изменения их процентных значений.

В ходе исследования установлено увеличение относительных значений клеток-предшественников кортикальных тимоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) во всех экспериментальных группах (на 3-и, 7-е и 14-е сутки), а в случае второй и третьей группы – в среднем в два раза, по сравнению с контролем (0,26 (0,16–0,33); $P < 0,05$) (на 21-е сутки). В случае сочетанного применения F1 + КО с МДП или тДНК показано статистически значимое ($P < 0,01$) увеличение содержания CD3⁺CD4⁻CD8⁻-клеток (на 3-и и 14-е сутки).

Для оценки степени активации Т-лимфоцитов и моноцитов нами был проведён анализ экспрессии высокоаффинного рецептора IL-2 (CD25), отражающего способность клеток к пролиферации и дифференцировке.

Как показали исследования, у мышей всех экспериментальных групп наблюдалось увеличение численности активированных Т-лимфоцитов, в частности Т-хелперов (на 3-и, 14-е и 21-е сутки). Следует также отметить, что препарат F1 + КО как самостоятельно, так и в сочетании с тДНК активирует CD3⁺-клетки в большей степени ($P < 0,05$), чем F1 + КО + МДП. Возрастание числа активированных CD3⁺CD8⁺-клеток у мышей, получивших препараты F1 + КО и F1 + КО + тДНК, выявлено на 21-е сутки, в то время как F1 + КО + МДП не оказывает существенного влияния на экспрессию CD25 цитотоксическими Т-лимфоцитами (Таблица 2).

Анализ экспрессии CD25 моноцитами и макрофагами крови показал, что сочетанное применение препарата F1 + КО с тДНК или МДП приводит к снижению их содержания в ранние сроки наблюдения (3-и сутки), по сравнению с контролем ($P < 0,01$).

У экспериментальных животных, получивших F1 + КО, корреляционный анализ показал взаимосвязь количества лейкоцитов с моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и лимфоцитами, Т-лимфоцитами, Т-хелперами, CD3⁺CD4⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁻CD8⁻. Кроме того, установлено, что у мышей второй группы показатели лейкоцитов крови коррелируют только с содержанием лимфоцитов ($r_s = 0,51$; $P = 0,02$), а у мышей третьей группы – с нейтрофилами ($r_s = 0,67$; $P = 0,008$), лимфоцитами ($r_s = 0,75$; $P = 0,003$); Т-лимфоцитами ($r_s = 0,61$; $P = 0,02$), цитотоксическими Т-лимфоцитами ($r_s = 0,61$; $P = 0,001$) и CD3⁺CD4⁻CD8⁻ ($r_s = 0,56$; $P = 0,001$).

Таблица 2 – Содержание Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами

Препарат	Сроки, сутки	Ед. изм.	Показатель		
			Т-лимфоциты (CD3 ⁺)	Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD8 ⁺)
FI + КО (n = 7)	3	%	66,4 (62,9–72,5)**	55,0 (50,5–59,9)*	11,4 (10,5–13,8)
		× 10 ⁹ /л	1,11 (0,99–1,49)**	0,90 (0,78–1,11)**	0,20 (0,16–0,31)**
	7	%	55,6 (42,6–57,1)*	39,79 (30,2–42,0)	11,7 (9,2–13,8)
		× 10 ⁹ /л	2,25 (1,92–2,91)	1,62 (1,52–2,19)	0,50 (0,35–0,61)
	14	%	56,7 (55,8–64,2)	42,2 (38,7–50,7)	10,9 (9,4–11,3)
		× 10 ⁹ /л	1,74 (1,58–1,84)**	1,33 (1,20–1,45)*	0,30 (0,24–0,31)*
21	%	59,3 (52,1–65,8)	44,9 (42,2–48,2)	10,9 (8,9–16,4)	
	× 10 ⁹ /л	2,09 (2,03–2,90)	1,65 (1,52–2,00)	0,41 (0,34–0,46)	
FI + КО + тД НК (n = 7)	3	%	74,6 (73,0–75,9)**	56,3 (52,3–58,5)**	15,6 (14,9–18,0)**
		× 10 ⁹ /л	3,07 (2,36–3,44)*	1,99 (1,64–2,59)	0,61 (0,60–0,70)*
	7	%	67,2 (62,3–76,2)**	53,3 (46,9–59,9)*	14,3 (14,0–16,4)**
		× 10 ⁹ /л	2,67 (2,03–3,49)	2,13 (1,49–2,69)*	0,67 (0,47–0,72)*
	14	%	64,8 (58,1–71,2)	48,8 (43,9–58,9)	13,4 (10,5–16,0)*
		× 10 ⁹ /л	2,50 (1,84–3,48)	1,95 (1,33–2,57)	0,46 (0,42–0,63)*
21	%	73,4 (68,1–78,4)**	56,8 (49,1–57,6)*	15,0 (13,7–15,0)**	
	× 10 ⁹ /л	2,35 (2,20–2,70)	1,76 (1,65–1,82)	0,44 (0,42–0,60)	
FI + КО + МД П (n = 7)	3	%	67,5 (66,2–69,1)**	50,4 (49,6–51,9)	13,6 (13,1–14,7)**
		× 10 ⁹ /л	2,63 (2,01–3,89)	1,95 (1,51–2,93)	0,57 (0,40–0,82)*
	7	%	81,2 (75,2–81,3)**	60,1 (55,7–67,2)**	16,3 (12,9–20,9)**
		× 10 ⁹ /л	2,25 (1,84–3,13)	1,89 (1,42–2,46)	0,36 (0,29–0,55)
	14	%	63,7 (56,9–69,9)	47,8 (39,8–53,1)	13,1 (11,6–14,3)*
		× 10 ⁹ /л	5,07 (3,13–5,86)**	2,61 (2,31–2,98)**	0,67 (0,65–0,83)**
21	%	71,2 (63,1–72,4)**	55,6 (49,7–59,6)*	11,0 (9,5–14,6)	
	× 10 ⁹ /л	1,81 (1,10–2,18)	1,71 (1,51–2,05)	0,24 (0,22–0,38)**	
Контроль ЗФР (n = 12)		%	58,7 (48,1–64,1)	47,0 (36,8–50,6)	10,1 (8,4–11,7)
		× 10 ⁹ /л	2,22 (1,9–2,7)	1,76 (1,52–2,36)	0,41 (0,32–0,49)

Примечание: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$, по сравнению с контролем.

Следует отметить, что при анализе взаимосвязей между субпопуляциями лимфоцитов установлены прямые корреляционные связи относительных показателей Т-лимфоцитов с

CD3⁺CD4⁺-клетками у мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами. В группе экспериментальных животных, иммунизированных препаратом F1 + КО в сочетании с тДНК, показано наличие дополнительных корреляций содержания моноцитов, экспрессирующих CD25, с нейтрофилами. Также, у мышей второй группы выявлены корреляционные связи нейтрофилов с CD3⁺CD4⁺CD25⁺ и CD3⁺CD25⁺, а у мышей третьей группы – с CD3⁺CD8⁺CD25⁺, в то время как у мышей, получивших F1 + КО, подобные корреляции отсутствуют.

Исследования показали наличие корреляционных связей незрелых популяций Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁻, CD3⁺CD4⁺CD8⁺) с активированными клетками у мышей, иммунизированных F1 + КО в сочетании с МДП или тДНК.

Выявленные в процессе исследования множественные корреляционные связи между популяциями лейкоцитов у мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами, указывают на повышение сопряжённости между клетками иммунной системы и свидетельствуют об интенсивной иммунной реакции.

Таким образом, комплексный препарат вакцинного штамма чумного микроба на основе КО и F1-антигена, а также его сочетанное применение с тДНК или МДП повышают пролиферацию предшественников тканевых макрофагов и гранулоцитов, что согласуется с ранее полученными данными о стимулирующем влиянии этих препаратов, а также препаратов туляремийного микроба на продукцию цитокинов и гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (Авдеева Ж. И. и др., 2015). Увеличение содержания Т-хелперов, экспрессирующих CD25, при иммунизации мышей экспериментальными препаратами указывает на повышение пролиферативной активности этих клеток.

Данное обстоятельство, на наш взгляд, является важным, поскольку возбудитель чумы блокирует ключевые механизмы системы врождённого иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кратко резюмируя изложенные выше материалы, можно констатировать, что по совокупности проведенных исследований комплексный препарат на основе КО и F1-антигена *Y. pestis* обладает иммуногенной активностью для белых мышей. Адьюванты тДНК и МДП повышают функциональную активность клеток иммунофагоцитарной системы. На основании вышеизложенного и данных литературы нами предложена концептуальная схема (Рисунок 4) закономерностей изменений функционального состояния клеток иммунной системы под действием антигенного препарата на основе F1-антигена и клеточных оболочек *Y. pestis* в сочетании с тДНК и МДП.

Безусловно, важен факт успешного применения этого антигенного препарата в качестве средства, повышающего резистентность организма экспериментальных животных в отношении *Y. pestis*. С учётом данных литературы об иммуногенных свойствах F1-антигена чумного микроба, материалов о влиянии *Y. pestis* на неспецифическую резистентность организма экспериментальных животных представляется возможным гипотетически сформулировать комплекс факторов, обеспечивающих иммунокорректирующее действие экспериментального препарата. Антигенный препарат F1 + КО повышает показатели НСТ-теста, активность МПО, НАДФ·Н-диафоразы и содержание НКБ, обеспечивая высокий уровень бактерицидной способности фагоцитов; адьюванты (тДНК и МДП) оказывают иммуномодулирующее действие, которое проявляется в регуляции активности ферментов кислородзависимого и кислороднезависимого метаболизма фагоцитов. Активированные моноциты синтезируют ИЛ-1α, оказывающий аутокринное действие, а также способствующий активации Т-лимфоцитов, синтезирующих В-клеточный ростовой фактор (ИЛ-4). TNF-α действуя синергично с ИЛ-12, повышает функциональную активность цитотоксических Т-лимфоцитов и их способность к разрушению инфицированных бактериями клеток, что ведёт к элиминации возбудителя.

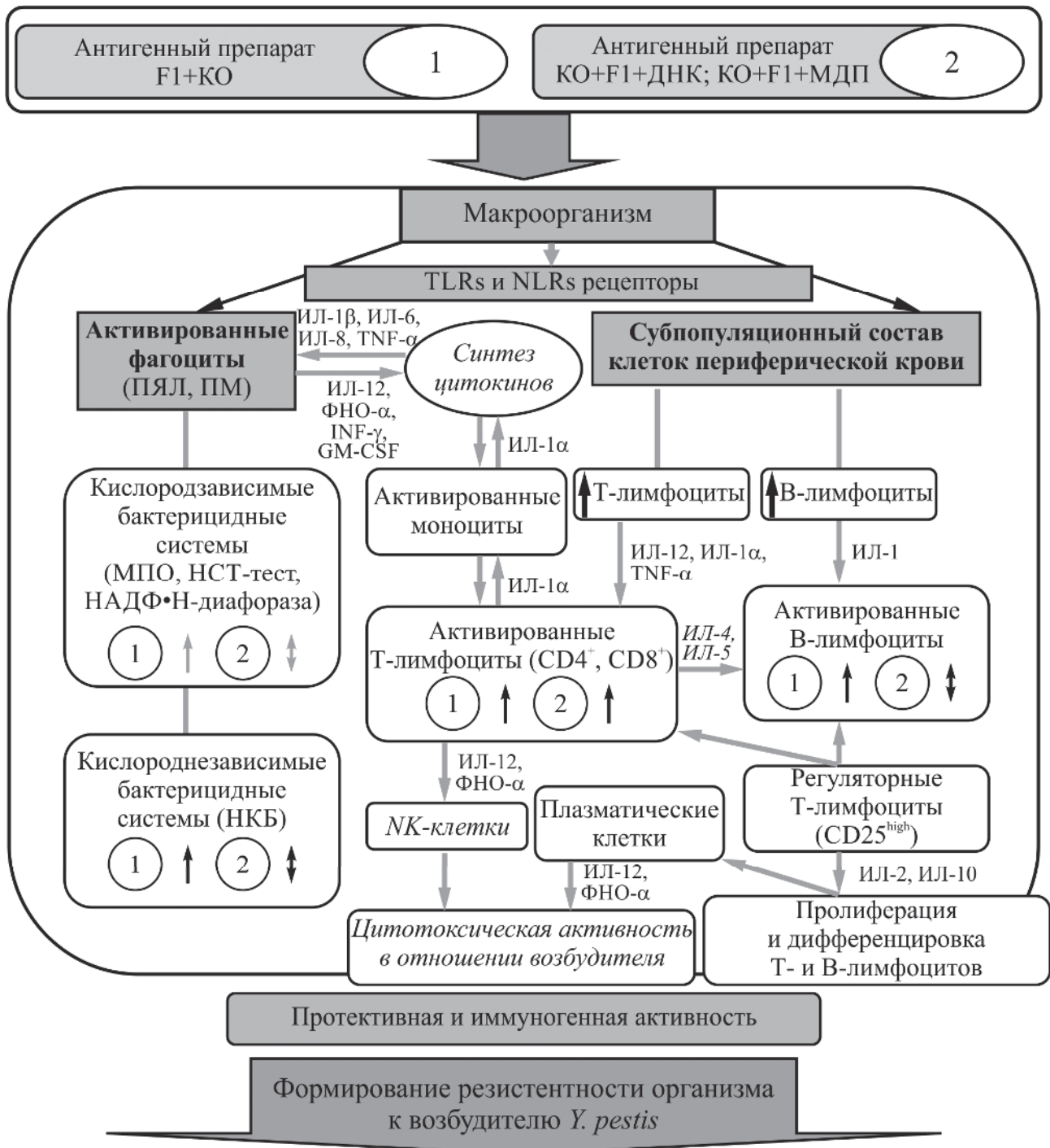


Рисунок 4 – Концептуальная схема механизмов действия антигенного препарата *per se* и в сочетании с адъювантами на функциональное состояние клеток иммунной системы экспериментальных животных: ↑ – активация; ↓ – модуляция; данные литературы выделены курсивом; 1 – антигенный препарат F1 + КО; 2 – антигенный препарат КО + F1 + ДНК, КО + F1 + МДП.

В процессе иммуногенеза, вызванного антигенным препаратом F1 + КО, а также его сочетанным применением с тДНК и МДП, активируется пролиферация иммунокомпетентных клеток и модуляция апоптоза.

Таким образом, полученные в ходе диссертационного исследования результаты способствуют раскрытию молекулярных механизмов функционирования бактерицидных систем фагоцитов под воздействием компонентов субклеточных фракций *Y. pestis*, что является основой для повышения резистентности организма экспериментальных животных к

Y. pestis. Сконструированный антигенный препарат, включающий КО + F1 *Y. pestis* в сочетании с адьювантами (тДНК и МДП), может быть рекомендован в качестве возможного кандидата для создания вакцинного препарата, безопасного и эффективного, обладающего ярко выраженной способностью активировать неспецифический иммунитет и стимулировать формирование адаптивного иммунного ответа организма.

ВЫВОДЫ

1. Созданный антигенный комплекс *Y. pestis* на основе клеточных оболочек, фракции 1 и ДНК, характеризуется высокой чистотой и специфичностью каждой составляющей, доказанной с помощью УФ-скопии, иммуноблотинга, дот-иммуноанализа, реакции иммунодиффузии, иммуноферментного анализа и реакции пассивной гемагглютинации.

2. Стимулирующее влияние комплексного препарата КО + F1 и его сочетанное применение с тДНК или МДП в условиях *in vitro* заключается в повышении максимальной активности кислородзависимого метаболизма клеток иммунофагоцитарной системы лейкоцитов крови и перитониальных макрофагов экспериментальных животных на 41,5 %; нитроксидзависимого – на 37,1 % и кислороднезависимого – на 14,1 %.

3. Иммуномодулирующий эффект комплексного препарата КО + F1 и его сочетанное применение с тДНК или МДП выражается в сбалансированной продукции про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-18, TNF- α , IFN- γ), а также M-CSF, GM-CSF, PDGF-BB, VEGF и MIG. Установлено, что КО + F1, ДНК и МДП на 3-и сутки развития иммунного ответа обладает выраженным стимулирующим действием на продукцию IFN- γ и IL-12 (p40), а IL-10 на 7-е сутки, препятствуя чрезмерной продукцией провоспалительных цитокинов.

4. Наиболее выраженное повышение функциональной активности Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови мышей, иммунизированных препаратами, увеличивается и достигает максимума на 7-е сутки эксперимента при применении КО + F1 + МДП и составляет для Т-лимфоцитов 81,2 %, Т-хелперов – 60,1 %, цитотоксических Т-лимфоцитов – 13,1 %.

5. Комплексный препарат, включающий F1-антиген и КО *Y. pestis*, обладает высокой протективной активностью, подтвержденной 100%-й выживаемостью животных после введения вирулентного штамма *Y. pestis* И-2683 в дозе LD₅₀. Адьюванты тДНК и МДП способствуют повышению иммунологической эффективности субклеточных фракций чумного микроба.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Протективная активность субклеточных фракций *Yersinia pestis* при экспериментальной чуме у белых мышей / Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев, Т. Ю. Загоскина, **В. С. Половинкина** и др. // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2004. – № 1 (2). – С. 123–127.

2. Половинкина **В. С.** Структура и иммуноадьювантные свойства CpG-ДНК / **В. С. Половинкина**, Е. Ю. Марков // Медицинская иммунология. – 2010. – Т. 12, № 6. – С. 469–476.

3. Влияние субклеточных фракций чумного микроба на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками белых мышей / **В. С. Половинкина**, А. В. Корнева, К. Ю. Козулина и др. // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 3 (2). – С. 217–221.

4. **Половинкина В. С.** Иммуноадьювантные свойства мурамилдипептида / **В. С. Половинкина**, Е. Ю. Марков // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 1. – С. 149–153.
5. Актуальные вопросы совершенствования специфической профилактики чумы и сибирской язвы / С. А. Витязева, С. В. Балахонов, В. И. Дубровина, Е. Ю. Марков, **В. С. Половинкина** // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – № 4 (71). – С. 63–66.
6. Оценка иммуномодулирующих свойств субклеточных фракций чумного микроба в сочетании с адьювантами / В. В. Войткова, В. И. Дубровина, С. А. Витязева, **В. С. Половинкина** и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 4 (75). – С. 63–66.

Патент

7. Способ получения иммуногенного препарата из *Yersinia pestis* EV : Пат. 2248217 Рос. Федерация ; МПК⁷ А 61 К 39/02 / Марков Е. Ю., Голубинский Е. П. Саппо С. Г., Николаев В. Б., **Половинкина В. С.** Попова Ю. О., Иванова Т. А. ; заявитель и патентообладатель Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. – № 2003115185/13 ; заявл. 22.05.2003 ; опубл. 20.03.2005. – Бюл. № 8. – 5 с.

Публикации в иных изданиях

8. Влияние ДНК чумного микроба на протективную активность изолированных антигенов возбудителя чумы / **В. С. Половинкина**, Е. Ю. Марков, Е. П. Голубинский, В. Б. Николаев и др. // Медицинская микробиология – XXI век: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. – Саратов, 2004. – С. 185–186.
9. Получение иммуногенного микрокорпускулярного комплекса на основе изолированных мембранных структур и капсульного антигена чумного микроба / Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев, Т. Ю. Загоскина, Т. А. Иванова, **В. С. Половинкина** и др. // Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний: Тезисы докл. междунар. конф. – Новосибирск : ЦЭРИС. – 2004. – С. 260.
10. Протективная активность антигенных комплексов, полученных на основе изолированных мембранных структур чумного микроба с использованием экзогенных иммуностимуляторов / Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев, **В. С. Половинкина**, Т. А. Иванова и др. // Противочумные учреждения России и их роль в обеспечении эпидемического благополучия населения страны: Материалы конф., посв. 70-летию Противочумного центра. – М. : РОО ЛО «Сокольники». – 2004. – С. 90–94.
11. Патоморфологические данные к оценке иммуногенности антигенов чумного микроба / С. Г. Саппо, Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев, Т. А. Иванова, Т. П. Старовойтова, **В. С. Половинкина** и др. // ФГУЗ Иркутский н.-и. противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора РФ. – Иркутск, 2005. – 19 с. – Деп. в ВИНТИ 13.01.06 г., № 29-В2006.
12. Protective activity of *Yersinia pestis* EV antigenic complex with the immunostimulators and combined use of doxycyclin / E. Yu. Markov, V. B. Nikolaev, T. A. Ivanova, E. P. Golubinsky, T. I. Innokenteva, V. I. Dubrovina, **V. S. Polovinkina** et al. // Scientific Journal of Center for Infectious Diseases with Natural Foci. – 2005. – P. 176–184.
13. Применение антигенного комплекса *Yersinia pestis* EV в сочетании с иммуномодуляторами при экстренной профилактике чумы / В. И. Дубровина, Т. А. Иванова, Е. Ю. Марков, С. А. Витязева, В. Б. Николаев, Т. П. Старовойтова, Л. А. Грищенко, **В. С. Половинкина** // Инфекции, обусловленные иерсиниями : Матер. II Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – СПб., 2006. – С. 68–70.
14. Патоморфологические данные к оценке иммуногенности антигенов чумного микроба / С. Г. Саппо, Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев, Т. А. Иванова, Т. П. Старовойтова, **В. С. Половинкина** и др. // Матер. IX съезда Всерос. науч.-практ. общ-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов – М. : Санэпидмедиа, 2007. – Т. 1. – С. 98.

15. Бактерицидное действие растворов мочевины и цетилтриметиламмонийбромида на клетки *Yersinia pestis* EV / В. Б. Николаев, Т. А. Иванова, **В. С. Половинкина**, Е. Ю. Марков // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 162–163.
16. Получение микрокорпускулярного антигенного комплекса, способного формировать напряженный иммунитет против чумы на фоне экстренной неспецифической профилактики / **В. С. Половинкина**, Т. А. Иванова, В. Б. Николаев, Е. Ю. Марков // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 178–179.
17. Влияние субклеточных фракций чумного микроба на функциональное состояние бактерицидных систем фагоцитов *in vitro* / **В. С. Половинкина**, Ж. А. Коновалова, В. И. Дубровина, Е. Ю. Марков и др. // Современные технологии обеспечения биологической безопасности : Матер. науч.-практ. школы-конференции молодых учёных и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора. – Оболенск, 2010. – С. 129–131.
18. Influence of *Yersinia pestis* subcellular fractions on functional state of bactericidal system of phagocytes *in vitro* / **V. S. Polovinkina**, Z. A. Konovalova, V. I. Dubrovina, E. Yu. Markov et al. // Current Issues on Zoonotic Diseases. – 2010. – N 18. – P. 236–241.
19. Влияние субклеточных фракций чумного микроба в сочетании с адьювантами на экспрессию CD25 клетками крови белых мышей / В. В. Войткова, **В. С. Половинкина**, С. А. Витязева, К. М. Корытов // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т. 4, № 1. – С. 59.
20. Иммуномоделирующее действие металлосодержащих нанокompозитов / Под ред. д.м.н. проф. С. В. Балахонова. – Иркутск: ИНЦХТ, 2017. – С. 84.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CD	– кластер дифференциации
F1	– фракция 1 чумного микроба
NO	– оксид азота
GM-CSF	– гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, англ. colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage), GM-CSF)
IL-	– интерлейкины (1, 4, 6, 10 и т. д.)
MCP	– моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 и -2
M-CSF	– макрофагальный колониестимулирующий фактор
MD-2	– адаптерная молекула, обеспечивающая стабильность TLR4/CD14 комплекса
MIP	– макрофагальный воспалительный белок-1 α и -1 β
PAMPs	– патоген-ассоциированная молекулярная структура (англ. pathogen associate molecular patterns)
TLR	– Toll-подобный рецептор
TNF- α	– фактор некроза опухоли
VEGF	– фактор роста эндотелия сосудов
АГ	– арабиногалактан
ЗФР	– забуференный 0,9%-й раствор хлорида натрия, pH = 7,2
ИКК	– иммунокомпетентные клетки
ИС	– индекс стимуляции
Ис	– индекс содержания
КЗМ	– кислородзависимый метаболизм
КО	– клеточные оболочки
КФД	– комплекс антигенов чумного микроба, состоящий из КО + F1 + ДНК
КФДМ	– комплекс антигенов чумного микроба, состоящий из КО + F1 + ДНК + МДП
ЛД ₅₀	– доза испытуемого агента, вызывающая гибель 50 % взятых в опыт животных
м. м.	– молекулярная масса
МДП	– мурамилдипептид
МПО	– миелопероксидаза
НАДФ	– никотинамидадениндинуклеотид фосфат окисленный
НАДФ·Н	– никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный
НКБ	– неферментные катионные белки
НСТ	– нитросиний тетразолий
ПА	– протективный антиген сибиреязвенного микроба
ПК	– плазматические клетки
ПМ	– перитонеальные макрофаги
ПЯЛ	– полиморфноядерные лейкоциты