

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

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

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
доктор биологических наук
В. И. Дубровина
Научный консультант:
доктор биологических наук
Е. Ю. Марков

Иркутск – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Современные представления о механизмах фагоцитоза <i>Yersinia pestis</i> и его роли в формировании резистентности макроорганизма.....	12
1.2 Способы повышения иммуногенности и протективной активности бактериальных антигенов противочумных вакцин.	31
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1 Штаммы бактерий.....	43
2.2 Экспериментальные животные.....	44
2.3 Химические реактивы, диагностические препараты и иммуномодуляторы.....	46
2.4 Выделение субклеточных фракций и антигенов чумного микроба, создание искусственного антигенного комплекса.....	46
2.5 Аналитические методы.....	49
2.5.1 Химические и физико-химические методы.....	49
2.5.2 Иммунохимические методы исследования.....	50
2.6 Определение протективной активности.....	52
2.7 Определение острой токсичности	52
2.8 Получение макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов.....	53
2.9 Определение фагоцитарной активности макрофагов.....	54
2.10 Определение метаболитов кислорода в фагоцитах.....	55
2.11 Определение активности миелопероксидазы.....	56
2.12 Определение активности NO-синтазы.....	57
2.13 Определение содержания неферментных катионных белков.....	57
2.14 Методы выявления цитокинов.....	58
2.14.1 Выявление цитокинов иммуноферментным методом.....	58
2.14.2 Выявление цитокинов методом проточной флюориметрии	59

2.15	Определение фенотипа клеток крови.....	59
2.16	Статистические методы.....	63
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....		64
3.1	Получение субклеточных фракций и антигенов возбудителя чумы, создание искусственного антигенного комплекса	64
3.2	Физико-химические свойства субклеточных фракций и антигенов, искусственного антигенного комплекса <i>Y. pestis</i> EV.....	71
3.3	Иммунохимические свойства субклеточных фракций и антигенов, искусственного антигенного комплекса чумного микроба.....	73
3.4	Установлене саногенетических механизмов протективной активности искусственного антигенного комплекса <i>Y. pestis</i> EV и в сочетании с адьювантами	77
3.4.1	<i>Протективная активность субклеточных фракций, адьювантов и искусственного антигенного комплекса чумного микроба.....</i>	77
3.4.2	<i>Протективная активность искусственного антигенного комплекса чумного микроба в сочетании с иммуномодуляторами различного происхождения.....</i>	82
3.5	Функциональное состояние бактерицидных систем фагоцитов <i>in vitro</i> под действием искусственных антигенных комплексов чумного микроба в сочетании с адьювантами.....	87
3.6	Продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками белых мышей под действием субклеточных фракций чумного микроба.	91
3.7	Субпопуляционный состав клеток крови белых мышей под действием субклеточных фракций чумного микроба	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		104
ВЫВОДЫ.....		118
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ		120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		124

ВВЕДЕНИЕ

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 так же потенциальная возможность применения ее возбудителя в качестве агента биотерроризма, обуславливает необходимость разработки надежных средств специфической профилактики [46, 266, 288]. На сегодняшний день с этой целью в мире применяется ряд отечественных и зарубежных лицензированных противочумных вакцин [6, 17, 40, 271]. Тем не менее, проблема специфической профилактики чумы, по-прежнему, актуальна, поскольку существующие вакцины далеки от совершенства [232, 235, 267]. Так, в число их недостатков входят: формирование непродолжительного иммунитета, отсутствие гарантированной защиты от заболевания легочной 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 [38, 60, 65]. Все перечисленные недостатки служат основанием для конструирования новых вакцин и повышения их эффективности за счет использования адъювантных препаратов [111, 215, 293, 298].

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) [259], липополисахарид (ЛПС), основной соматический антиген (ОСА) [5, 18, 174]. Однако, очищенные или синтезированные антигены и антигенные детерминанты, взятые отдельно, как правило, не способны индуцировать выраженный иммунный ответ [169, 260]. 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 [116, 220, 234].

С учетом 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 [16, 18, 31, 38, 83].

Кроме того, для повышения эффективности химических вакцин применяют адъюванты – синтетические и природные биополимеры, обладающие иммуномодулирующим действием [2, 7, 154, 166].

В настоящее время установлено, что бактериальная ДНК (бДНК) является патоген-ассоциированной молекулярной структурой (pathogen associate molecular patterns, PAMPs) [90, 278, 289], обладающей адъювантными свойствами, которые способствуют иницированию каскада реакций, приводящих к синтезу провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками и активации механизмов иммунологической защиты организма [21, 212].

Перспективным синтетическим адъювантом, также входящим в число PAMPs, является мурамилдипептид (N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин, МДП) [22, 36, 39].

Таким образом, исследование пригодности различных антигенов и субклеточных фракций *Y. pestis*, подбор адъювантов и создание искусственных антигенных комплексов, обеспечивающих целенаправленное действие последних на иммунную систему организма человека и животных, может явиться основой получения высокоиммуногенных препаратов, что определяет актуальность для практического здравоохранения в области разработки эффективных и слабо реактогенных химических вакцин против чумы [17, 38, 42, 218].

Цель исследования – выявить механизмы формирования резистентности организма животных к *Y. pestis* под действием искусственно созданных антиген-

ных 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 зависит 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 провосполительных 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), монокин, индуцируемый IFN- γ - MIG, 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 адьювантов 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 22.05.2003 «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 адьювантами (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 адьювантами для повышения резистентности организма экспериментальных животных в отношении *Y. pestis*.

Практическая значимость исследований подтверждена. Результаты исследования вошли в монографию «Иммуномодулирующее действие металлосодержащих нанокompозитов» (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, им-

муноцитометрические и статистические методы). 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 счет применения тДНК *Y. pestis* EV НИИЭГ и МДП.

2. Антигенные комплексы на основе КО и F1 антигена чумного микроба в сочетании с адъювантами (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 учетом и оценкой результатов, 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 ученых и специалистов: «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболенск, 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, две – в иностранных журналах, монография и патент на изобретение.

В основу диссертационной работы положены исследования, проведенные 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 нанобиоконпозитов природного происхождения для повышения неспецифической резистентности макро-

организма», 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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные представления о механизмах фагоцитоза *Yersinia pestis* и его роли в формировании резистентности макроорганизма

Чума – особо опасное инфекционное заболевание, которое до сих пор продолжает оставаться серьезной угрозой для здоровья населения не только в своих природных очагах, но и при выносе возбудителя за пределы энзоотичной территории [55]. Не исключено также и то, что чумной микроб может быть применен в качестве агента биотерроризма. Все это вместе обуславливает необходимость разработки надежных средств профилактики и лечения чумы [17]. В практике здравоохранения использовали две коммерческие чумные вакцины – живую вакцину на основе аттенуированного штамма *Y. pestis* EV эталонной линии НИИЭГ (вакцина живая сухая – ЖЧВ), выпускаемую в настоящее время в России, и убитую вакцину USP, на основе вирулентного штамма *Y. pestis* 195/P, США ("Cutter Biological") [40].

Основными недостатками USP вакцины является то, что она защищает от бубонной, но не от легочной чумы, ревакцинация проводится ежегодно, для развития иммунитета необходимы неоднократные введения препарата, а так же необходимость работы с вирулентным штаммом до момента его инактивации, значительная стоимость препарата и наличие местной реакции у 11–24 % и общей реакции у 4–10 % вакцинированных. Живую чумную вакцину *Y. pestis* EV не используют в ряде стран мира, так как ранее, до момента определения причины аттенуации вакцинного штамма EV, считалась возможной его реверсия к вирулентности [6, 38]. Другими недостатками данной вакцины являются формирование непродолжительного иммунитета, ее способность, независимо от путей введения, вызывать тяжелые местные и системные реакции, летальную инфекцию у некоторых видов низших приматов, а так же необходимость соблюдения холодной цепи при хранении и транспортировке вакцины [6, 28, 38, 40].

Таким образом, разработка надежных средств специфической профилактики чумы на сегодняшний момент остается одним из перспективных направлений.

Несмотря на то, что многолетние интенсивные исследования чумного микроба, особенностей пато- и иммуногенеза вызываемой им инфекции определили стратегию разработки вакцин, тем не менее, конструирование надежных средств специфической профилактики чумы продолжается до сих пор [6, 38, 235].

Наряду с созданием живых вакцин перспективным считается разработка химических (субъединичных) вакцин на основе протективных антигенов *Y. pestis* пригодных для защиты от бубонной и легочной формы чумы [4, 65, 232, 293].

У чумного микроба обнаружено свыше сотни антигенов, однако большая часть из них дает перекрестные иммунологические реакции с биополимерами самого различного происхождения и поэтому не пригодна для конструирования субъединичных вакцин [17, 252].

Известно, что одним из основных кандидатов для конструирования химической вакцины и признанным протективным антигеном *Y. pestis* является F1 чумного микроба. Это наиболее изученный видоспецифичный АГ чумного микроба, который широко используется в качестве аналита для конструирования диагностических и вакцинных препаратов, а так же в научных исследованиях патогенеза этой инфекции. F1 участвует в образовании на поверхности клеток чумного микроба при 37 °С белковополисахаридной капсулоподобной структуры, помогающей возбудителю чумы противостоять фагоцитозу, вероятно, за счет нарушения последнего на уровне рецепторного взаимодействия или формирования водонепроницаемых пор в мембране фагоцитирующих клеток [128, 256, 273].

Биогенез капсулы чумного микроба осуществляется при участии четырех генов *caf* оперона с молекулярной массой около 4 мДа (*cafI*, *cafIR*, *cafIM*, *cafIA*). Оперон локализуется на плазмиде pFca, молекулярная масса которой колеблется от 60 до 65 мДа (110 kb) [101, 268]. F1 (17 кДа) кодируется *cafI* геном (*cafI* – от англ. capsular antigen F1), в свою очередь состоит из сигнального пептида (21 аминокислоты) и зрелого белка с молекулярной массой 15,5 кДа (149 аминокислот, рI 4.3), однако для секреции и сборки требуется наличие и других генов [128,

256]. *caf1R* синтезирует активатор транскрипции, белок с молекулярной массой 36 кДа, инициирующий экспрессию капсулы при 37 °С. *caf1M* кодирует переплазматический шаперон, белок с молекулярной массой 26,5 кДа, осуществляющий посттрансляционный фолдинг и транспортировку F1-субъединицы к внешней мембране клетки *Y. pestis*. *caf1A* кодирует якорный белок размером 90,4 кДа, участвующий в сборке и прикреплении капсулы на клеточной поверхности. Гены собраны в 3 транскрипционные единицы, две из которых (*caf1M-caf1A*, *caf1*) ориентированы в одном направлении, третья транскрипционная единица – *caf1R*, ориентирована в противоположную сторону. Регион между *caf1M* и *caf1R* генами состоит из двух промотерных элементов также ориентированных в противоположные стороны. Существуют штаммы не экспрессирующие F1, так, штамм *Y. pestis* K25 содержит спонтанную делецию в межгенном районе *caf1M* и *caf1R*. Гены, кодирующие капсулу чумного микроба, были детально изучены, клонированы и секвенированы [277, 292]. Рекомбинантный F1 сохраняет иммуногенные и протективные свойства присущие нативному капсульному антигену [108, 177, 184, 259].

F1 формирует на поверхности *Y. pestis* гелеобразную капсулу – высокомолекулярный биополимер, состоящий из линейных полимерных фибрилл с молекулярной массой 2–3 мДа, образованных Caf1 субъединицами и собранных на поверхности бактериальной клетки. Сборка таких фибриллярных конструкций осуществляется по шаперон-опосредованному пути, при участии CafM периплазматического белка-шаперона. F1 субъединица перемещается из цитоплазмы к переплазматическому пространству, взаимодействует с CafM и димеризуется, затем димер экспортируется на бактериальную поверхность, где при участии белка CafA из димеров синтезируются фибриллы и формируется капсула. Полимерные фибриллы, в свою очередь, могут диссоциировать на субъединицы или олигомеры. Вторичная структура капсульного антигена образована, в основном, β -тяжами [128, 256]. Упаковка молекулы F1 происходит за счет водородных и гидрофобных взаимодействий без образования дисульфидных связей [277, 292]. И согласно одной из моделей F1 формирует вокруг клетки *Y. pestis* бислой с внутренней гидрофобной областью, образованный сотнями Caf1 димеров [128, 277].

Капсульный антиген F1 *Y. pestis* является гликопротеином. Гликозилирование F1 предположительно осуществляется в результате ферментативной посттрансляционной модификации корового белка Caf1, который, соединяется с олигомерным галактоном, и образует гликопротеин. Было показано, что это, вероятно, второй видоспецифический компонент сложной полимерной капсулы, видимо, кодируется генами, локализованными на хромосоме *Y. pestis* [253].

Первые препараты очищенного капсульного антигена содержали более 5 % (по сухому весу) молекул галактолипида, галактозы и фукозы, в результате чего F1 и был назван гликопротеином. Однако дальнейшие исследования выявили, что F1, полученный по методу E. E. Baker с соавт., был контаминирован полисахаридными компонентами клеточной стенки *Y. pestis*, главным образом ЛПС. С помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) была продемонстрирована перекрестная реакция полученного таким образом препарата поверхностного антигена с антисыворотками против клеток *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Salmonella* [101, 174, 268].

Более поздние протоколы выделения и очистки капсульного антигена показывали уже 0,1 % и 0,01 % примесей – липидов и углеводов [128].

Формирование F1 капсулы находится под строгим температурным контролем, и, при температуре ниже 35 °C, *in vitro* или в организме переносчика – блохи обнаруживается небольшая капсула, или не обнаруживается вообще. Напротив, в течении чумной инфекции у млекопитающих, при температуре 37 °C и выше *caf1* является одним из наиболее высоко экспрессирующихся генов, а F1 является наиболее многочисленным поверхностным эпитопом, определяемым у *Y. pestis*.

Экспериментальный поиск T- и B-клеточных эпитопов антигена F1 проводили с использованием синтетических пептидов, соответствующих отдельным участкам аминокислотной последовательности этого белка [101, 128].

B-клеточный эпитоп, доступный для антител, выглядит как гидрофильная петля на поверхности полимерной молекулы [268, 277]. В опытах с поликлональной мышинной антисывороткой и моноклональными антителами к белку F1 установили, что участок аминокислотной последовательности 72–95 зрелого белка F1

является В-клеточным эпитопом [101, 256]. Который вплотную прилегает к самому мощному Т-клеточному эпитопу, включающему фрагмент аминокислотной последовательности 51–71. Область между 100 и 150 аминокислотами также соответствует Т-клеточному эпитопу [128, 268].

Также установили основные и вспомогательные антигенные сайты белка F1. Для этой цели были идентифицированы и синтезированы пептидные молекулы, соответствующие различным фрагментам С-концевой области F1. Конкурентный ингибиторный анализ с использованием различных комбинаций антисывороток указал на пептид, соответствующий участку аминокислотной последовательности белка F1 142–165, как на иммунодоминантный секвенциальный эпитоп. Выявили, что данный участок полипептидной цепочки экспонируется на поверхности молекулы белка F1 [101, 256, 292].

Было проанализировано распределение F1 в клетке *Y. pestis*. Фракционирование клеток *Y. pestis* с последующим электрофоретическим анализом белков в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблотинг показали, что зрелые формы F1 локализуются не только на клеточной поверхности, но и в экстрацеллюлярном матриксе и цитоплазме. Электронная микроскопия клеток *Y. pestis*, обработанных специфическими антителами, мечеными частицами коллоидного золота, подтвердило двоякое распределение F1 в клетках чумного микроба [101, 268].

Также было показано, что свободный F1 обнаруживается в супернатанте культуры *Y. pestis*, а так же в пробах от пациентов (кровь, моча, мокрота, отделяемое из бубона), в тканях инфицированных животных [128, 256].

Устойчивость возбудителя чумы к фагоцитозу коррелирует с ростом F1 капсулы на поверхности клетки *Y. pestis*. Несмотря на эту корреляцию, многочисленные исследования F1 мутантных штаммов *in vivo* на мышинной модели, не выявили однозначной роли капсульного антигена в вирулентности. Исследования на мышах, морских свинках и крысах показали, что F1 капсульный антиген требуется *Y. pestis* для достижения полной патогенности, как при бубонной, так и при легочной чуме. Так, при легочной чуме, мутантные по *caf* гену штаммы F1⁻, сохраняющие вирулентность для мышей, достоверно показывали ослабление способно-

сти колонизировать легкие и селезенку, по сравнению со штаммами дикого типа. Кинетические исследования *caf* мутантных штаммов на мышинной модели бубонной чумы также показали, что удаление *cafI* приводит к достоверному сокращению способности *Y. pestis* колонизировать лимфатические узлы и диссеминировать селезенку и легкие. Однако исследования мутантных F1⁻ штаммов, при легочной чуме, на модели африканских зеленых мартышек не выявили существенного снижения вирулентности F1⁻ мутантных штаммов [73, 101, 256, 268].

Иммунитет к чуме коррелирует с наличием антител к F1, иммунизация капсульным антигеном защищает лабораторных животных от чумной инфекции [256]. Очищенный белок F1 *Y. pestis*, как и рекомбинантный препарат F1, при подкожной иммунизации обеспечивал определенную степень защиты мышей от летальной заражающей дозы вирулентного штамма, вводимого аэрозольно, внутрибрюшинно или подкожно [128, 277, 292]. Однако F1, введенный мышам внутрижелудочно, не предохранял животных против чумной инфекции [73, 128]. Вместе с тем, мыши, получившие перорально взвесь микробных клеток рекомбинантного штамма *S. typhimurium*, продуцирующего F1, были защищены от летальной дозы вирулентного штамма *Y. pestis*, вводимого подкожно [108, 174].

Показано, что F1 является активным индуктором синтеза цитокинов, которые регулируют кооперативное взаимодействие фагоцитов. Однако, хотя F1 и является протективным видоспецифичный АГ, исследования показали, что наличие фракции 1 не обязательно для проявления вирулентности чумного микроба на мышинной модели. Кроме того, среди штаммов, выделенных в природных очагах чумы, были обнаружены штаммы, продуцирующие низкие уровни или вовсе лишенные F1, сохраняющие вирулентность для мышей и обезьян. Сообщалось также о выделении из вакцинированных F1⁺-штаммами чумного микроба мышей полностью вирулентных мутантов *Y. pestis*, лишенных F1 [73]. Таким образом, F1, в качестве основной протективной составляющей, вероятно, не является идеальным компонентом противочумной вакцины [6, 256].

Вместе с тем, показана возможность усиления иммуногенных свойств противочумных вакцин на основе F1 за счет присутствия других антигенов *Y. pestis*,

существенных для вирулентности. Как показали исследования, в дополнение к F1, оптимальная вакцина может содержать в качестве иммуногенов LcrV (V антиген), ЛПС, ОСА и ряд других антигенов [110, 115, 197, 287].

Так, клеточные оболочки грамотрицательных бактерий содержат в своем составе такие компоненты как ЛПС, пептидогликан (муреины, мукопептиды, гликопептиды), и другие PAMPs, которые и обеспечивают КО адьювантную активность [15, 61, 145, 159]. Поглощаясь клетками иммунной системы, такие PAMPs специфически взаимодействуют с паттерн-распознающими рецепторами (PRRs), которые запускают сигнальные пути, активирующие неспецифический иммунитет организма, вместе с тем, этот класс рецепторов опосредованно влияет практически на все клетки иммунной системы [20, 22, 67, 258].

Компоненты КО активируют целый ряд PRRs, так, они являются лигандами семейства Toll-подобных рецепторов [194, 217].

У человека, в целом, было идентифицировано 10 TLRs (у других млекопитающих – 12), функционирующих как одно семейство специфических PRRs. TLRs распознают консервативные PAMPs, в число которых входят такие компоненты КО как ЛПС, взаимодействующий с TLR4, пептидогликан и липопротеин (Lpp), являющиеся лигандами TLR2 [32, 149, 199, 217].

Пептидогликан и его составляющие также являются лигандами членов семейства Nod-подобных рецепторов (NLRs), таких как внутриклеточные рецепторы врожденного иммунитета NLR1 и NLR2. У млекопитающих их обнаружено более 20 [39, 151, 194].

Связывание лиганда с рецептором приводит к целому ряду событий внутри клетки, которые заканчиваются активацией ядерного фактора NF- κ B, MAP-киназы и выработкой ряда ключевых цитокинов (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), а также антиген презентующих молекул [94, 163, 289]. Взаимодействуя с рецепторами-мишенями, компоненты КО имитируют естественный процесс обнаружения бактерий и их фрагментов иммунной системой организма хозяина. Таким образом, иммунная система использует компоненты КО в качестве «сигнала опасности»,

указывающего на присутствие чужеродного инфекционного агента, активирует в ответ на него соответствующие защитные механизмы [115, 194, 217].

Простота производства большинства КО и упаковки в них целевого антигена, или ряда антигенов и адъювантных препаратов, делают их подходящими для использования в качестве комбинированных вакцинных препаратов. Дополнительным преимуществом КО в качестве компонента вакцины являются длительный срок хранения без необходимости использования холодной цепи, так как препараты КО возможно лиофилизировать. КО также обладают высокой биодоступностью [9, 83, 115].

Рядом авторов показаны иммуногенные свойства такой РАМР чумного микроба как ЛПС, который построен из короткой углеводной (олигосахаридной) цепи, присоединенной к липиду А [98, 129, 169, 227]. В его молекуле выделяется консервативный пентасахаридный фрагмент, называемый внутренним кором, который характерен для всех диких штаммов энтеробактерий. Он включает три остатка *L-глицеро-D-манно-гептозы* (LD-Нер) и два остатка *3-дезоксид-D-манно-окт-2-улозоновой кислоты* (кетодезоксиоктоновой кислоты, Kdo). Во внутренний кор йерсиний, входит также остаток *D-глюкозы*, присоединенный к первому от липида А остатку гептозы (LD-НерI) [97, 101, 128, 255]. Внутренняя область кора служит рецептором большинства бактериофагов, специфичных к ЛПС *Y. pestis*, включая фаг A1122 группы T7, используемый Центрами контроля и предотвращения заболеваний США для фагодиагностики *Y. pestis*. Гликозидная связь остатка Kdo, находящегося на восстанавливающем конце внутреннего кора, соединяет кор с липидом А [123, 259, 256, 276].

Выявление структурно-функциональных взаимосвязей ЛПС *Y. pestis* открывает новые пути к разработке эффективных живых чумных вакцин на основе аттенуированных штаммов с пониженной реактогенностью [65, 91, 176, 271]. В зависимости от стадии существования в организме блохи или млекопитающего на *Y. pestis* действуют сигналы внешней среды, прежде всего температура, которая во многом определяет спектр экспрессирующихся на данный момент генов и, соответственно, антигенный состав, характерный для векторной и/или гостальной

фазы существования бактерии [40]. Так, при температуре 28 °С, свойственной условиям пребывания *Y. pestis* в пищеварительном тракте блохи, в клетках *Y. pestis* синтезируется гексаацильный ЛПС содержащий 6 жирнокислотных остатка, который, в отличие от тетраацильного ЛПС, синтезирующегося при температуре 37 °С в теплокровном организме, является мощным индуктором системы врожденного иммунитета млекопитающих за счет распознавания и связывания с TLR4. Сразу после проникновения чумного микроба в организм теплокровного хозяина, в результате укуса инфицированной блохи, *Y. pestis* с гексаацильным ЛПС распознаются TLR4, подвергаются фагоцитозу и гибнут в нейтрофилах, однако выживают и размножаются в макрофагах дендритных клетках (CD11c⁺/CD11b⁻), а также в моноцитах [40]. В связи с чем, перспективным представляется подход, основанный на генно-инженерной модификации ЛПС *Y. pestis*, предполагающей снижение степени ацилирования липида А [40, 154]. Способность избегать распознавания защитной системой хозяина на самом раннем этапе внедрения позволяет аттенуированному штамму с мутантным ЛПС быстро размножиться, но отсутствие одного из основных факторов патогенности вследствие мутации, использованной для аттенуации, не дает инфекции генерализоваться [40, 59, 97, 155]. В дальнейшем это обеспечивает эффективную выработку антител к основным антигенам чумного микроба и формирование приобретенного иммунитета. Использование генетически модифицированного чумного микроба, экспрессирующего гексаацильный ЛПС, который, в отличие от тетраацильного, синтезирующегося при температуре 37 °С и выше у *Y. pestis*, распознается рецепторным комплексом TLR4-MD2-CD14, что приводит к активации воспалительного и адаптивного иммунного ответа, и, в дальнейшем, к защите от заражения диким типом чумного микроба [40].

Альтернативным подходом в терапии чумы может стать создание эффективных и высокоселективных антимикробных препаратов нового поколения на основе высокоаффинных олигонуклеотидных лигандов. Выяснение генетического контроля ключевых этапов биосинтеза ЛПС, вмешательство в которые нарушает

функционирование внешней мембраны и ослабляет действие других факторов вирулентности, позволит предложить новые молекулярные мишени для таких антибиотиков [6, 82, 276]. Было показано, что полное удаление ИЛ-10 из организма лабораторных животных (в результате мутации или применения моноклональных антител к ИЛ-10), инфицированных *Y. pestis*, приводило к повышению устойчивости к заражению [113].

В настоящее время установлено, что бДНК обладает всеми необходимыми для РAMPs свойствами, выражающимися в стимуляции врожденного иммунитета и способности формировать защиту от микробных инфекционных агентов у позвоночных животных [168, 212, 258]. Эти свойства связаны с наличием в молекуле бДНК неметилированных CpG динуклеотидов и могут имитироваться синтетическими CpG-ОДН [217, 278, 289]. CpG динуклеотиды – это участки ДНК, где нуклеотиды G и C соединены фосфатом в линейную последовательность (-дезоксцитидин-фосфат-дезоксигуанозин-), при помощи фосфодиэстеразной связи. Несмотря на принципиальное сходство в строении и структуре, бДНК существенно отличается от ДНК позвоночных животных и человека. Различается, в том числе и характер метилирования CpG динуклеотидов. Считается, что метилирование ДНК в CpG динуклеотиде свойственно в основном эукариотам и заключается в присоединении метильной группы к цитозину в позиции C5 цитозинового кольца при помощи метилтрансферазы с образованием 5-метилцитозина. Стоит отметить, что у позвоночных животных метилировано 70–80 % CpG-сайтов. Бактериальная ДНК в CpG-сайтах метилированию не подвергается [212, 278]. CpG динуклеотиды в геноме позвоночных встречаются с частотой намного ниже ожидаемой, а также ниже, чем в геноме бактерий [289]. Многочисленные исследования начала 90-х годов прошлого столетия доказали, что именно неметилированные CpG динуклеотиды бДНК, стимулируют иммунную систему и активируют В- и NK-клетки [90]. Бактериальная ДНК, в отличие от ДНК позвоночных животных, является стимулятором клеток иммунной системы как при добавлении в культуру клеток, так и при введении лабораторным животным [212, 289].

В ряде работ был продемонстрирован ярко выраженный иммуностимулирующий эффект бДНК в защите лабораторных животных от заражения патогенными микроорганизмами [98, 212, 258]. Как показали исследования, проведенные за последнее три десятилетия, реакция организма хозяина на введение бДНК, в первую очередь, заключается в активации механизмов врожденного иммунитета представляющих собой первую «линию обороны» против возбудителей инфекционных заболеваний, паразитов и трансформированных клеток [138, 245].

Изучение влияния оснований, фланкирующих CpG динуклеотиды, на иммунную систему позвоночных животных позволило пересмотреть данные об иммуностимулирующем эффекте бДНК и неметилованных синтетических CpG-ОДН. Оказалось, что неметилованные CpG динуклеотиды стимулируют активность иммунной системы, независимо от того, входят ли они в состав геномной бДНК, или находится в форме синтетического ОДН. Однако уровень иммунных стимулирующих эффектов в большой степени зависит от оснований, фланкирующих CpG динуклеотиды [212, 289]. Последовательности, обладающие наибольшим воздействием на иммунную систему, имеют следующую нуклеотидную структуру: XCGY, где X – любое основание, кроме C, и Y – любое основание, кроме G. Наиболее выраженным активирующим воздействием на клетки иммунной системы человека обладают ОДН с последовательностью 5'-GTTCGTT-3', в то время как ОДН с последовательностью 5'-GACGTT-3' оптимальны для активации иммунокомпетентных клеток мыши. Олигодинуклеотиды, неимеющие в своем составе CpG динуклеотидов, не обладают иммуногенной активностью [258, 278, 289]. С учетом установленных фактов создан целый ряд синтетических неметилованных CpG-ОДН, пригодных для иммунотерапии различных инфекционных и онкологических заболеваний, отличающихся друг от друга, как по составу нуклеотидов, так и спецификой опосредуемых иммуностимулирующих эффектов. Позвоночные организмы заметно отличается от бактерий по составу оснований фланкирующих CpG динуклеотиды. Как оказалось, эти основания в геномах позвоночных животных не случайны: чаще всего перед CpG динуклеотидом встречается основание C, а после CpG динуклеотида наиболее часто встречается основание G.

Как было отмечено выше, такое расположение нуклеотидов, фланкирующих CpG динуклеотид супрессирует активацию иммунной системы. Именно эта разница в составе генетического материала позволяет макрофагам человека отличить бДНК от собственной ДНК [281].

Бактериальная ДНК и ее синтетические CpG-содержащие фрагменты входят в число консервативных PAMPs, распознаются иммунокомпетентными клетками благодаря наличию специфических рецепторов PRRs, и запускающих дальнейшую передачу сигнала. Таким рецептором оказался TLR9, который связывает неметилированные CpG-мотивы бДНК, распознает синтетические неметилированные CpG-ОДН [194]. Ключевую роль в индукции врождённого иммунитета играют TLRs, и в частности TLR9, опосредованно влияя практически на все клетки иммунной системы. Иммунная система в ответ на бДНК и ее синтетические CpG-содержащие фрагменты активирует соответствующие защитные механизмы [93]. TLR9 локализуется на мембране везикулярных компартментов клеток. Среди клеток иммунной системы человека только В-клетки и DC конститутивно экспрессируют TLR9. Эти клетки, путем эндоцитоза поглощают бДНК, которая далее поступает в эндосомальные компартменты, где связывается с TLR9, образуя сигнальный комплекс. Неметилированные CpG динуклеотиды, входящие в состав бДНК, стимулируют TLR9 и активируют клетку. У В-клеток активация TLR9 приводит к секреции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов IL-6 и IL-10. Увеличивается чувствительность В-клеток к антигенной стимуляции и активируется их дифференциация в плазматические клетки. У DC это приводит к секреции интерферона типа 1, который, в дальнейшем, активирует NK-клетки, моноциты и другие APCs. Также CpG-ДНК стимулирует созревание pDC в более эффективные APCs, способные активировать Т-клетки. TLR9 рецепторы не экспрессируются на покоящихся Т-клетках. Следовательно, способность CpG-ДНК – усиливать антиген-специфический CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточный ответ, является косвенным следствием CpG-индукции [90]. TLRs млекопитающих – это класс клеточных трансмембранных рецепторов, состоящих из двух доменов. TLR9 состоит из домена, богатого лейциновыми повторами (leucine-rich repeats – LRRs), локали-

зованного на внутренней поверхности мембраны везикулярных компартментов клетки, а также из цитоплазматического домена, имеющего гомологию с цитоплазматическим TLR-доменом ИЛ-1 [194, 217, 278]. В неактивном состоянии TLR9 находятся в мембране в мономерном состоянии. При активации специфическим лигандом, неметилованной CpG-ДНК, они димеризуются (образуется гомодимер), что приводит к последующей передаче сигнала внутрь клетки. TLR9 рецепторы участвуют в активации MyD88 зависимого сигнального пути, общего для всех членов семейства TLR (кроме TLR3) [168, 194, 258]. MyD88 (англ. Myeloid differentiation primary response gene 88) – цитозольный адаптерный белок, имеющий участок специфического связывания с активированными TLRs, является следующим звеном сигнального пути [258, 278, 289]. Он участвует в передаче сигнала от TLR9 на группу сигнальных киназ IRAK 1,4. IRAK4 является важнейшей функциональной киназой своей группы, её отсутствие или недостаточность приводят к нарушению иммунного ответа на бактериальные инфекции [64]. Цитозольный адаптерный белок (TRAF6) является важным звеном нескольких сигнальных путей в клетке, регулирующих воспаление и иммунитет. Далее сигнал от TRAF6, посредством целого ряда протеинкиназ и адаптерных белков, таких как ГТФ-связывающий белок Ras, внеклеточная протеинкиназа ERK, N-концевая киназа JNK, ИкВ-киназный комплекс (IKK α , IKK β , IKK γ), киназа TAK1, а также посредством реакций фосфорилирования и убиквитинизации, поступает сразу на два транскрипционных фактора. Во-первых, сигнал поступает на транскрипционный фактор IRF7, что индуцирует экспрессию интерферонов INF- α и INF- β . Во-вторых, сигнал поступает на транскрипционный ядерный фактор NF- κ B, что приводит к активации синтеза провоспалительных цитокинов. Таким образом, результатом активации TLR9 неметилованной CpG-ДНК является индукция экспрессии провоспалительных цитокинов: интерлейкинов (IL-1, IL-6), TNF- α , интерферонов (INF- α , INF- β , INF- γ) и антимикробных факторов. В целом TLR9 рецепторы участвуют в активации нейтрофилов, pDC, NK-клеток, стимулируют функциональную активность фагоцитов, участвуют в генерации реактивных форм кислорода и активации NO-синтазы [194, 217, 262, 289].

Олигодезоксинуклеотиды, содержащие иммуностимулирующие CpG-мотивы, в настоящее время рассматриваются как новый класс адъювантов. Адъювантное действие CpG-ДНК заключается в способности опосредованно, через DC или другие APCs, активировать цитокиновую секрецию лимфоцитами Th1-типа, а также стимулировать В-клетки, продуцирующие антитела к эпитопам антигенов бактериального и опухолевого происхождения. Основным преимуществом CpG-ДНК, как адъюванта, является отсутствие выраженной токсичности. Поэтому использование CpG-ОДН в качестве адъюванта было одобрено Глобальным консультативным комитетом по безопасности вакцин (ГККБВ) ВОЗ. CpG-ДНК активирует секрецию Th-1 тождественных цитокинов и хемокинов, оказывает анти-апоптотический эффект на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. Таким образом, даже в отсутствие CD4⁺ Т-хелперов, происходит генерация цитотоксических Т-лимфоцитов. Было установлено, что CpG-ОДН индуцируют более сильный Th-1 иммунный ответ, чем другие вакцинные адъюванты, также прошедшие испытания на мышинных моделях (адъювант Фрейнда, соли алюминия). Однако, сопутствующая активация регуляторных путей, приводящих к противоположным эффектам, таким как, индукция регуляторных Т-клеток (Tregs), снижает TLR9-опосредованную активацию иммунной системы [194, 217, 289]. CpG-ОДН выбраны адъювантами для широкого спектра экспериментальных вакцин, включающих в свой состав белковые и пептидные антигены, живые или убитые вирусы, DC, полисахаридные конъюгаты. Совместное введение, комплексирование антигена и CpG-ОДН может оптимизировать индукцию антиген-специфического иммунного ответа [148, 214]. Кроме того, для повышения адъювантной активности CpG-ОДН компоненты вакцины, возможно, вводить в комплексе с различными носителями: наночастицами, микросферами, липосомами, что способствует активации сильного антиген-специфического иммунного ответа [122, 149, 168]. В частности, показано, что за счет иммобилизации CpG-ОДН на полилактид-ко-гликолидных микросферах удастся сократить размер ОДН с минимальных 12 оснований до 5–7 оснований [21, 157, 258]. Адъювантная активность CpG-ОДН может быть повышена за счет конъюгации с субъединицей В холерного токсина [194, 261].

Дальнейшие перспективные направления исследований CpG-вакцин связаны с изучением механизмов воздействия неметилованной CpG-ДНК и ее синтетических аналогов на различные звенья иммунитета, а так же разработкой вопросов их клинического применения [122, 289].

Перспективным синтетическим адьювантом, также входящим в число PAMPs, является мурамилдипептид (МДП) агонист NLR рецепторов, компонент клеточных стенок Грам «+» так и Грам «-» бактерий. МДП – минимальная структурная единица пептидогликана, обладающая адьювантной активностью [14, 36, 64]. Установлено, что МДП напрямую или опосредованно активирует и модулирует иммунный ответ, как на клеточном, так и на гуморальном уровне [20, 99, 194].

В качестве иммуногенного адьюванта в составе вакцин, МДП усиливает антимикробную активность, стимулирует активность фагоцитов, дендритных клеток (ДК), моноцитов и макрофагов, увеличивает на поверхности этих клеток экспрессию рецепторов, вовлеченных в процессы адгезии и поглощения АГ. МДП стимулирует процессинг и презентацию входящих в состав вакцин АГ APCs, усиливая, таким образом, индукцию АТ и АТ-опосредованную цитотоксичность [14, 22]. МДП, при совместном введении с другими иммуномодуляторами и адьювантами, способен активировать дифференцировку и пролиферацию лимфоцитов [99, 194]. Многочисленные исследования на различных клеточных моделях (*in vitro*), в том числе и на линиях клеток крови человека, мононуклеарных клетках периферической крови, клеточных линиях моноцитов и макрофагов показали синергическое взаимодействие МДП и бактериального ЛПС, агониста TLR4 рецепторов [217].

На сегодняшний момент ведется ряд научно-исследовательских работ по включению МДП и его производных в состав различных вакцин, наряду с белковыми и пептидными антигенами. Так, в опытах на лабораторных животных было показано, что МДП обладает ярко выраженным адьювантным эффектом в смеси с экспериментальными субъединичными вакцинными препаратами против чумы. Было изучено действие комплекса капсульного антигена, клеточных оболочек чумного микроба с МДП *Y. pestis* EV на продукцию цитокинов разного профиля

иммунокомпетентными клетками экспериментальных животных [167, 284]. Согласно полученным данным МДП оказывает стимулирующее влияние на продукцию макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ИЛ-12, монокин, индуцируемый IFN- γ (MIG), TNF- α , ИЛ-10, гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), IFN- γ . Комплексный препарат, содержащий МДП, достоверно оказывает стимулирующее влияние на продукцию цитокинов: IL-18, ИЛ-12, VEGF, GM-CSF, TNF- α . Совместное введение комплекса КО и F1 чумного микроба с МДП дает возможность оптимизировать индукцию антиген-специфического иммунного ответа [75, 83]. Благодаря широкому спектру иммуностимулирующих свойств, МДП является перспективным адъювантом. В связи с чем, исследования иммуностимуляторов этого класса связаны с созданием новых эффективных производных МДП, изучением механизмов их воздействия на различные звенья иммунитета, а так же разработкой вопросов их клинического применения [9, 36, 79].

Благодаря успехам, достигнутым в молекулярной биологии, иммунологии, биотехнологии и генной инженерии, по мере накопления знаний о механизмах иммунитета, перед исследователями открылись новые перспективы по созданию и усовершенствованию противочумных вакцин и адъювантных препаратов [51, 55, 67, 102]. Однако, несомненно, продолжает оставаться актуальным вопрос о том, какие антигены *Y. pestis*, в каком виде и соотношении должны входить в состав эффективных противочумных вакцин [74, 102, 208, 269].

Как показали многочисленные исследования, F1, видоспецифичный антиген чумного микроба, является наиболее эффективным протективным антигеном *Y. pestis*, и одним из основных кандидатов для конструирования новых вакцинных препаратов. Однако, для индукции выраженного иммунного ответа, в дополнение к F1, в оптимальной вакцине должны присутствовать и другие обеспечивающие вирулентность антигены *Y. pestis* [17, 75, 89, 287]. С учетом того, что в поверхностных структурах грамотрицательных бактерий сосредоточен важный антигенный материал, работы по созданию новых и усовершенствованию существующих вакцин с использованием очищенных поверхностных структур возбудителей чумы

остаются актуальными и на сегодняшний день. При разработке современных вакцинных препаратов против чумы необходимо так же учитывать, что к настоящему времени установлена существенная роль поверхностных структур во взаимодействии микробов с иммунной системой хозяина и в формировании протективного антибактериального иммунитета [6, 65].

Повысить эффективность химических чумных вакцин можно также за счет включения в их состав адъювантов, обладающих необходимым иммуномодулирующим действием [67, 259, 288].

Преимущества, которые приобретают вакцинные препараты благодаря включению в их состав компонентов, отличных от антигена, впервые была продемонстрирована в 1925 году G. Ramon показавшим, что антитоксический иммунный ответ на дифтерийный и столбнячный токсины можно усилить, добавляя к вакцинным препаратам неспецифические субстанции органические и неорганические происхождения, которые неспецифическим образом усиливали специфический иммунный ответ против какого-либо антигена и получили название адъювантов [38, 119, 283].

Метод оценки активности предполагаемого адъюванта, является весьма существенным с точки зрения пригодности в клинике результатов лабораторных экспериментов. Традиционно, начиная с работ G. Ramon (1925) и L. Diens (1936), антиген вводят с адъювантом и без него и сравнивают эффективность иммунного ответа. Гуморальный иммунный ответ измеряют какой-либо разновидностью высокочувствительных тест-систем, таких как радиоиммунный анализ или твердофазный ИФА. Наличие клеточного иммунитета устанавливают в реакции гиперчувствительности замедленного типа *in vivo* или *in vitro*, измеряя стимуляцию Т-клеток специфическим антигеном. Тем не менее, окончательный вывод об эффективности вакцинного адъюванта должен основываться на его соответствии желаемой цели, а именно: защите от инфекции [110, 135, 363].

Используемые для повышения иммунного ответа вспомогательные вещества должны быть хорошо охарактеризованными, эффективными в достижении желаемой цели, стабильными при отсутствии холодильного оборудования и неток-

сичными. Вместе с тем, они должны обеспечивать биологическую совместимость с организмом, щадящий контакт с его тканями, не травмирующий их, постепенно биodeградировать с образованием безвредных продуктов [2, 70, 110].

В индукции T_H -клеточного ответа участвуют три типа сигналов: 0, 1 и 2. Теоретически, адьюванты могут действовать на каждый из этих трех сигналов. Недавно разработанные адьюванты – агонисты TLR (например, монофосфорил липид А – МФЛ) были отнесены к адьювантам А типа [137]. Адьюванты, нацеленные на APCs или способствующие захвату антигенов, отнесены к В типу (например, гидроокись алюминия) [112, 151]. Они действуют на 1 сигнал, поскольку их эффект опосредован усилением презентации антигенов Т-клеткам. Специфические лиганды костимуляторных молекул (например, агонист CD28 TGN1412) могут усиливать сигнал 2 и относятся к С типу адьювантов. Сигнал 3 представлен медиаторами, доставляемыми от APCs к Т-клеткам, например, ИЛ-12 [137, 194, 231, 298].

Многие адьюванты, как, оказалось, являются лигандами TLR, интрацеллюлярных RIG (retinoic-acid-inducible gene)- и NOD-подобных рецепторов, таким образом, оказываются многообещающими препаратами для усиления иммуногенности субъединичных вакцин [194, 258, 278].

Использование различных адьювантов, таких как водно-масляные эмульсии на основе метаболизируемых масел природного происхождения (сквален, акулий жир, арахисовое масло) [126, 166, 178, 205], бактериальные ЛПС и их нетоксичные дериваты (например, МФЛ) [97, 137, 140, 276], природные полисахариды (хитозан) [141], инактивированные бактериальные экзотоксины [71, 172, 240], рекомбинантные молекулы холерного токсина, лишенные токсичности [395]), белки теплового шока (БТШ) [120, 191, 294], бактериальный флагеллин [66], сульфолипциклодекстрин и синтетические сульфолипополисахариды [96, 179] и эфиры сахарозы и сульфатов жирных кислот [195], бактериальные липопротеины, липоаминокислоты и липопептиды [124], МДП и его производные [36, 99, 219, 225], синтетические неионные блочные сополимеры [123, 134, 285, 298] неметилированные CpG-динуклеотиды бДНК [212, 289, 290].

К настоящему времени нет такого адъюванта, который бы полностью удовлетворял всем предъявляемым к нему требованиям. Многие адъювантные композиции весьма токсичны для человека. В настоящее время подбор адъювантов для вакцинации людей ведут на компромиссной основе, сочетая требования необходимости наличия адъювантной активности и низкого уровня побочных эффектов [44, 110, 144]. Фактически же для производства вакцин в медицине пока используют только несколько адъювантов, среди которых – гели солей или гидроксида алюминия [135]. По-видимому, эти соединения, несмотря на ряд существенных ограничений и токсичность [139, 272], и в дальнейшем будут использоваться при приготовлении вакцин для человека, учитывая их превосходные адъювантные свойства, механизм действия, при совместном введении с различными антигенами [112, 150, 151]. Соединения кальция является естественным компонентом организма и не способствует повышению синтеза IgE [127, 139]. Наряду с этим, в стадии разработки находятся несколько других композиций, в частности адъювантов природного (в частности, бактериального и растительного) [37, 92, 108, 136] и искусственного происхождения [53, 206, 250].

1.2 Способы повышения иммуногенности и протективной активности бактериальных антигенов противочумных вакцин

Проблема специфической профилактики чумы, по-прежнему актуальна, поскольку эффективной противочумной вакцины до сих пор не существует. На сегодняшний день в мире применяется ряд отечественных и зарубежных лицензированных противочумных вакцин, как на основе аттенуированных штаммов, так и убитых. Для специфической профилактики чумы в Российской Федерации применяют как живые, так и химические вакцины. Живые вакцины, полученные на основе аттенуированных вакцинных штаммов микроорганизмов, имеют ряд недостатков, связанных с тем, что действующим началом этих препаратов являются живые микроорганизмы. Существующие химические вакцины, полученные на основе убитых микробных клеток или грубоочищенных и инактивированных формалином, являются мало контролируемыми комплексными смесями веществ бактериальной природы и далеки от совершенства. Как живые, так и химические вакцины, в целом, нестабильны при хранении, обладают недостаточно высокой эффективностью, непродолжительностью действия или индуцируют развитие побочных реакций [65, 151, 213]. Кроме того, для существующих вакцинных препаратов характерно содержание большого количества балластных (для формирования протективного иммунитета) веществ, не всегда безвредных для человека. Которые могут вызывать непредсказуемые побочные эффекты у прививаемых, ингибировать или нейтрализовать действие протективных антигенов. Кроме того, многие иммуногенные компоненты микробных клеток или их экзопродукты (например, ЛПС и бактериальные экзотоксины) высокотоксичны и не могут быть использованы в клинической практике без соответствующей инактивации [6, 117].

Нет также и единого мнения о преимуществах и недостатках тех или иных существующих вакцин, методах учёта эффективности прививок, показаниях к ним и даже о способах иммунизации. Так, в число недостатков входит: во-первых, возможная утрата иммуногенности при хранении живых вакцин, во-вторых, реактогенность, в-третьих, формирование непродолжительного иммунитета и, в-

четвертых, отсутствие гарантированной защиты от заболевания легочной чумой. Кроме того, большинство аттенуированных живых вакцин непригодны для применения в условиях проведения экстренной профилактики чумы антибиотиками. Все перечисленные недостатки существующих противочумных вакцин служат основанием для поиска и разработки новых вакцинных препаратов и адъювантов, способных повышать резистентность к чуме [68, 213, 266].

С появлением новых биохимических методов очистки и современной биотехнологии (синтез олигопептидов, техника рекомбинантных ДНК и плазмид) появились надежды на получение эффективных вакцин, основанных на отдельных эпитопах протективных антигенов или даже только одних генах, кодирующих их синтез («генетическая» или ДНК-опосредованная вакцинация) [94, 95, 122]. Такому прогрессу способствовали несколько фундаментальных открытий: получение рекомбинантных ДНК [236] и моноклональных антител, гипотеза idiotипической сети [106, 107, 244, 251], концепции генов иммунного ответа [124], процессинга и презентации антигенов [79, 130], фенотипической коррекции генетического контроля иммунного ответа [55], генетической вакцинации, осуществляемой за счет экспрессии кодируемых бактериальными плазмидами антигенов в клетках организма-хозяина, PAMPs и их распознающих рецепторов (PRRs) врожденной иммунной системы, включая TLR [189].

Достижения иммунологии, молекулярной биологии микроорганизмов и изучение протективных антигенов во второй половине XX века показало, что большинство молекулярных компонентов микроорганизма для индукции иммунитета не требуется, и что при определенных условиях иммунный ответ может быть усилен введением в организм небольшой части детерминант сложнейших антигенных комплексов.

Эти открытия заложили основу для разработки новых стратегий вакцинации против инфекционных заболеваний. Вот некоторые из них:

- 1) Использование технологии рекомбинантной ДНК для получения биотехнологических продуцентов микробных белковых антигенов, включая гибридные

молекулы, которые могут экспресироваться в бактериальных, дрожжевых, растительных и животных клетках [173, 243, 265, 281].

Субъединичные вакцины, получаемые с использованием рекомбинантных белков, отличаются от традиционных вакцин дороговизной в связи с большими затратами на проведение очистки антигенов. Несмотря на меньшую реактогенность, рекомбинантные вакцины, как правило, оказываются менее иммуногенными [98, 110, 114, 185]. Для того чтобы субъединичная вакцина была эффективной, рекомбинантный АГ должен подвергаться соответствующей посттрансляционной модификации и обладать соответствующей нативному белку конформацией. На иммуногенность и протективную активность конечного продукта может влиять тип используемой системы экспрессии. Например, гипотетический АГ может достаточно эффективно экспресироваться в клетках *Escherichia coli*, но лишь частично приобретать конформацию, присущую нативному АГ. Поэтому рекомбинантный АГ может быть иммуногенным, но при этом не содержать эпитопы, требуемые для индукции синтеза соответствующих нейтрализующих антител [180, 201, 236].

2) Использование техники рекомбинантных ДНК для получения живых вакцин за счет внедрения генов, кодирующих синтез протективных антигенов (в том числе белков *Y. pestis* [174], *Francisella tularensis* [97]), в геном вируса корьей оспы или других вирусов [169] или аттенуированных штаммов ряда бактерий (*S. typhi* Ty 21a, *S. typhimurium* и др.) и *V. cholerae* [87, 92]. Необходимо отметить получение трансгенных растений, которые планируется использовать в качестве мукозных вакцин [49, 193]. Среди недостатков метода – риск, присущий использованию всех живых вакцин [19, 37, 158, 172].

3) Применение антиидиотипических антител (АИ-антитела), которые имитируют антигенную структуру соответствующего эпитопа и могут индуцировать протективный иммунитет [88, 131, 247]. В качестве антиидиотипических иммуногенов для вакцинации могут быть использованы искусственно созданные рекомбинантные АИ-антитела и идиопептиды [106, 107, 121]. Особенно перспективными являются работы по использованию моноклональных АИ-антител, специфич-

ных по отношению к антителам против липида А, в качестве основы для создания вакцин против грамотрицательных бактерий [123, 244, 251].

4) Использование искусственных пептидов, которые участвуют в формировании соответствующих протективных эпитопов (белковой и полисахаридной природы) вирусов, бактериальных или паразитарных антигенов с целью индукции нейтрализующего иммунного ответа против агента вызывающего заболевание [260]. Синтетическим путем получены обладающие протективным эффектом в эксперименте (в конъюгированном виде или в смеси с подходящим адьювантом) пептиды – аналоги некоторых эпитопов бактериальных (дифтерийный, холерный и шигеллезный токсины), паразитарных (протективные белки возбудителей малярии, шистосомозов) и вирусных (поверхностные белки вирусов гриппа и иммунодефицита человека) антигенов [109, 111].

Однако следует подчеркнуть, что проблема поиска, существенных для индукции протективного иммунитета, пептидных эпитопов в целом не решена. Дело осложняется тем, что, большинство антигенных детерминант белков, распознаваемых В-клетками, являются конформационными [105, 113, 184]. Гипотеза «селективной презентации антигена» [275] предполагает существование общего правила для создания вакцин и, если оно будет открыто, то станет возможным создание молекул для формирования желаемого типа иммунного ответа.

5) Бактериальные рекомбинантные плазмиды (ДНК-вакцин) приводит к экспрессии соответствующих микробных антигенов с последующей индукцией гуморального и клеточного иммунного ответа на введение последних [94, 119, 290]. На различных моделях экспериментальных животных продемонстрирован протективный характер иммунного ответа, индуцируемого ДНК-вакцинацией, в отношении различных инфекционных агентов [218]. ДНК-вакцины на основе бактериальных плазмид могут также обладать врожденной адьювантной активностью благодаря наличию CpG-мотивов. Эти метилированные участки ДНК характерны для бактериальных геномов и могут присутствовать в генах, кодирующих протективные антигены и внедренных плазмидную ДНК. [93].

Преимущества ДНК-вакцин заключаются в легкости их конструирования и перехода к массовому производству, высокой термостабильности и способности индуцировать полный спектр иммунных реакций организма хозяина [94, 163, 122]. Однако, остается открытым вопрос безопасности применения генетической вакцинации [218, 289].

Одним из актуальных направлений вакцинопрофилактики чумы является получение генно-инженерной живой вакцины на основе рекомбинантных штаммов микроорганизмов, в геном клеток которых были встроены генетические детерминанты F1 *Y. pestis*. Сконструированный российскими учеными рекомбинантный штамм *S. minnesota* R595 pFS1, синтезирующий F1, при подкожной иммунизации, по протективной активности не уступал коммерческой живой чумной вакцине в опытах на мышах при заражающих дозах вирулентного чумного штамма до 10^5 КОЕ. При разработке живой чумной вакцины были получены также agoA – аттенуированные варианты *S. typhimurium*, в клетки которых встраиваются плазмиды с геном, кодирующим биосинтез F1 *Y. pestis*. Показана эффективность оральной иммунизации мышей культурами рекомбинантных штаммов *S. typhimurium*, продуцирующих F1-антиген [37, 108, 174, 274].

Получены также авирулентные мутанты возбудителя псевдотуберкулеза, в клетки которых была трансформирована генно-инженерная конструкция – плаزمиды, несущая *caf*-оперон *Y. pestis*. Как показали результаты сравнительных исследований, при иммунизации указанными вариантами генно-инженерных микроорганизмов экспериментальные животные получают высокий уровень невосприимчивости к заражению культурами вирулентных штаммов *Y. pestis*, сравнимый с аналогичной дозой культуры микробов штамма EV [101, 102, 268, 277].

Еще одним вариантом получения высокоэффективной генно-инженерной живой чумной вакцины является конструирование авирулентного штамма *Y. pestis* с повышенной продукцией протективных антигенов. Так на основе *Y. pestis* созданы штаммы-суперпродуценты капсульного антигена, способные защищать от чумы мышей не менее эффективно, чем вакцинный штамм EV [108, 128, 174].

Первые испытания субъединичных, пептидных, идиотипических и ДНК вакцин показали их невысокую эффективность [98, 285]. Как оказалось, для получения эффективной молекулярной вакцины далеко недостаточно только идентифицировать, очистить или искусственно воспроизвести протективный антиген (антигенную детерминанту). Показано, что в очищенном или синтезированном (химически или с помощью рекомбинантной ДНК) виде эти препараты не способны индуцировать выраженный продолжительный иммунный ответ. По-видимому, это обусловлено нарушениями пространственного расположения антигенов в поверхностных структурах бактериальной клетки [79, 135, 180], изменением или даже исчезновением одних антигенных детерминант и появлением других, что неизбежно сказывается в дальнейшем на силе и направленности иммунного ответа [100, 121, 284].

Другая причина может заключаться в быстрой деградации и выведении из организма человека убитых микробных клеток и их отдельных антигенов или изменении их процессинга. Нельзя не учитывать и тот факт, что в отличие от нативных антигенов, входящих в состав интактных микроорганизмов, изолированные антигены чаще всего выделяются в мономерной форме. В настоящее время принято считать, что эти АГ слабоиммуногенны, плохо захватываются макрофагами; для высокой иммуногенности антиген должен быть представлен в мультимерной форме как, в целом микроорганизме [114, 233].

Одной из причин недостаточной эффективности традиционных убитых цельноклеточных вакцин могут быть неверно подобранные условия культивирования, что приводит к утере экспрессируемых *in vivo* антигенов, и обеззараживания патогенных бактерий в условиях современного производства, в результате чего изменяется качественный и количественный состав антигенов бактерий, изменяются их нативные свойства [18, 55, 78]. Поэтому для создания на основе изолированных антигенов молекулярных вакцин, необходимо разработать новые принципы повышения их иммуногенности, которые бы предусматривали поиск способов стимуляции иммунитета вопреки генетически детерминированной низкой реагируемости. Создание искусственных вакцин особого типа с включением в них

стимулирующего компонента открывает такую возможность за счет целенаправленного воздействия на иммунную систему организма на основе знания путей реализации генетического контроля иммунного ответа [152, 198, 238].

Варианты повышения иммуногенности Аг, как правило, сводятся к возвращению молекулам нативной структуры и корпускулярных свойств, созданию замедленной и регулируемой резорбции в месте введения с длительным поддержанием на определенном уровне концентрации антигенов в тканях организма (персистенция антигена), замедлению гидролиза антигена тканевыми ферментами, к целенаправленной доставке его в клетки иммунокомпетентных органов, вовлечению клеток зоны воспаления, стимуляции фагоцитоза и APCs, синтеза цитокинов и митогенному действию на лимфоциты, изменению баланса между Th1- и Th2-типами иммунного ответа [139, 239, 298].

б). Создание неживых микрокорпускулярных систем доставки антигенов за счет их сорбции (или конъюгирования) на поверхности или внедрения внутрь липосом, археосом [84, 160, 164, 182, 224, 230] и полученных без использования фосфолипидов липосом (новасом) [183], реконструированных вирусных или вирусоподобных частиц (виросом) [209, 210, 241], протеосом, изготавливаемых с использованием белков наружной мембраны менингококков и других бактерий [202, 223], мицелл неионных детергентов [186] и сапонинов (в виде адъюванта QS-21 или ИммуноСтимулирующего КОМПлекса – ИСКОМ) [207, 233, 260, 297], частиц агарозы [52], целлюлозы [108], желатина, коллоidalного золота [12, 53], полых везикул из наружных мембран [97, 223] или клеточных оболочек («теней») рекомбинантных бактериальных клеток [115, 220, 234]; грамположительного усиливающего матрикса (неживых, генетически немодифицированных частиц из клеток *Lactococcus lactis* (GEM) [211].

Сюда же следует отнести и изготовление из антигенного материала и биodeградируемых природных (белки, например, сывороточные альбумины, желатин [156, 203], казеинат натрия [204] и полисахариды, например, крахмал и соли альгиновой кислоты [127] и синтетических (полимеры и сополимеры молочной, гликолиевой и других органических кислот и аминокислот, полилактиды и т. п.) ма-

териалов имплантантов, микросфер, микрокапсул и ламеллярных частиц с контролируемой скоростью высвобождения антигенного материала [133, 163, 170, 188]. Полилактидные полимеры (полимолочная и полигликоливая кислоты, их сополимеры) уже разрешены к применению в клинике и в настоящее время на их основе приготовлены экспериментальные химические вакцины против дифтерии, столбняка, гепатита В и ВИЧ-инфекции [92, 162]. С точки зрения создания биodeградируемых полимерных носителей перспективными являются изготавливаемые полимеризацией L-тирозина полииминокарбонаты, особенностью которых является то, что при их деградации в организме животного образуются соединения, обладающие мощным адьювантным эффектом [263].

Создание полимерных матричных носителей (микрокапсул, микросфер) обеспечивает как сохранность антигенного материала и неизменность свойств, так и возможность регулирования скорости его высвобождения.

Применение метода микрокапсулирования и приготовления микросфер с регулируемой скоростью выделения антигенов для производства вакцин отличается следующими преимуществами: медленное высвобождение антигенного материала (с длительным поддержанием на заданном уровне концентрации антигенов в тканях организма) позволяет существенно снизить дозы вводимых в организм антигенных препаратов и частоту ревакцинаций [257], требующихся для поддержания напряженного иммунитета, за счет пролонгированной иммунологической стимуляции; целенаправленное поглощение инкапсулированного антигенного материала иммунокомпетентными клетками позволяет снизить количество вводимого с вакциной иммуногена, что особенно существенно для конструирования мукозальных вакцин.

К настоящему времени сформировалось представление об адьювантных системах не только как о матрицах для иммобилизации и адресного транспорта иммуногенных субъединиц. На роль адьювантов и носителей АГ выбирают макромолекулы, которые сами по себе обладают способностью стимулировать первичный неспецифический иммунный ответ. Активация последнего играет существенную роль в развитии специфического иммунитета, и, следовательно, повы-

шает эффективность иммунизации. В этой связи привлекает внимание природный полисахарид – арабиногалактан, выделенный из древесины лиственницы сибирской *Larix sibirica*. В отличие от других распространённых полисахаридов, применяемых в качестве полимерной матрицы (декстран, крахмал, карбоксиметилцеллюлоза) арабиногалактан обладает мембранотропными свойствами и не требует применения сложных методов гидролиза выделения и фракционирования для получения макромолекулы с необходимой молекулярной массой 10-14 кДа [15, 32, 70]. Он сочетает в себе все свойства, обязательные для современного адьюванта – (проявляет иммуномодулирующую активность, стабилизирует коллоидные системы, образует комплексы с другими молекулами и может доставлять их непосредственно в гепатоциты и макрофаги). Что позволяет рассматривать его, например, в качестве функционального компонента искусственной молекулярной сибиреязвенной вакцины. Установлено, что арабиногалактан в составе комплексной вакцины белкового АГ *Bacillus anthracis* 92 кДа проявляет протективную активность и повышает бактерицидный потенциал макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов за счет активации кислородзависимых и нитроксидзависимых бактерицидных систем [23].

С развитием CpG-технологии появились данные об использовании бактериальных неметилованных олигонуклеотидов в качестве адьювантных компонентов сибиреязвенных молекулярных вакцин [149].

Говоря о мелкодисперсных системах доставки антигенов, следует подчеркнуть, что микрочастицы с успехом используются для повышения иммуногенности не только изолированных антигенов, но и синтетических пептидов [161, 241, 256].

7). Введение в состав вакцин цитокинов, сигнальных последовательностей, ответственных за поступление антигенов в соответствующие компартменты APCs, белков, участвующих в миграции и хоминге лимфоцитов, и других эндогенных иммунорегуляторных факторов или их индукторов, белков, обладающих адгезивными свойствами, внедрение генов, кодирующих синтез указанных факторов, в вирусные, бактериальные или плазмидные векторы, создание химерных антигенов [42, 103, 153, 249] и т. п.

Действительно, было показано, что ряд цитокинов, включая IL-2, IL-7, IL-6, IL-15 и IFN- γ , повышают адьювантную активность липосом [118, 143, 180, 262]. В качестве альтернативы липосомам, содержащим цитокины, можно использовать липосомы, содержащие специальные адьюванты, способные индуцировать образование цитокинов в организме хозяина [228, 229, 262, 287].

8). Использование агонистов TLR и других рецепторов врожденного иммунитета в чистом (в том числе МФЛ) или конъюгированном с пептидами состоянии [98, 200, 279]. Известно, что агонистами для TLRs являются такие адьюванты как бактериальные ДНК и синтетические CpG компоненты (распознаются TLR9), флагеллин (TLR5), липопептиды – МФЛ (TLR4 и TLR2), ЛПС (TLR4), профилин (TLR 11) [165, 258], а также иммуностимуляторные РНК (TLR 7) [156, 203]. Агонистом Nod-подобных рецепторов является МДП (NLR2), RIG-подобных рецепторов – РНК вирусного происхождения. [150, 151, 208]. Взаимодействие PRRs с соответствующим адьювантом-агонистом запускает сигнальный каскад, индуцирующий экспрессию большого количества генов, в частности, генов провоспалительных цитокинов, молекул адгезии, острофазовых белков, ферментов воспаления. Введение адьюванта сопровождается активацией различных неспецифических механизмов иммунологической защиты, представляющих собой первую линию обороны против возбудителей инфекций. Совместное введение, вакцины и адьюванта оптимизирует индукцию антиген-специфического иммунного ответа. Однако вопрос о включения этих перспективных иммуномоделирующих препаратов в состав противочумных вакцинных препаратов не достаточно изучен.

Трудно предсказать, какой из множества возможных способов конструирования вакцин нового поколения будет наиболее выигрышным. Главное при создании новых вакцин, независимо от способа их приготовления, это полная экспрессия их иммуногенного и анамнестического потенциала. Усовершенствование вакцин должно коснуться качества, плотности и расположения эпитопов с использованием современных данных о взаимодействии клеток и иммунорегуляторной сети. Рассмотренные нами теоретические и экспериментальные аспекты, позволяют надеяться на возможность создания вакцин, имитирующих иммуногенный потен-

циал естественных патогенов [8, 180, 286]. Вакцина должна вызывать формирование продолжительного иммунного ответа на Т- и В-клеточных уровнях, против не полиморфных детерминант на поверхностной структуре патогена, которая являлась бы иммунодоминантной для максимально возможного ассортимента ГКС-гаптенев. Более того, необходимо предпринять усилия для максимального увеличения содержания детерминант, индуцирующих T_H - и В-клетки, и свести к минимуму содержание детерминант, стимулирующих образование T_S -клеток. Вместе с этим, «идеальная» вакцина должна быть поликомпонентной, вводиться перорально и создавать напряженную длительную защиту [94, 95].

На сегодняшний день можно считать, что практически все важнейшие компоненты макроорганизма, участвующие в сложной системе регуляции иммунного ответа открыты, но их суммарные количественно-временные эффекты в условиях противочумной вакцинации нуждаются в дальнейшем исследовании [6, 65, 67].

Сложность создания высокоэффективных вакцин против чумы обусловлена высокой вирулентностью возбудителя, связанной с синергическим взаимопотенцирующим действием комплекса разнонаправленных факторов, блокирующих ключевые барьерные механизмы системы врожденного иммунитета, препятствующих формированию макроорганизмом полноценного адаптивного иммунитета.

Перспективным направлением создания эффективных вакцин может быть использование препаратов несущих так называемые патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMPs). Эти структуры, целенаправленно воздействуют на системы врожденного иммунитета организма, так как распознаются специфическими рецепторами – PRRs) [17, 266, 271, 298].

Как показали многолетние исследования чумного микроба, наиболее важный протективный антигенный материал (липополисахариды, белки наружной мембраны, пептидогликан, F1 чумного микроба или капсульный антиген и другие PAMPs) находится в поверхностных структурах бактериальной клетки грамотрицательных бактерий (капсула, S-слои, наружные мембраны, клеточные стенки и оболочки бактериальной клетки в целом), они играют ведущую роль во взаимо-

действию микроба с микроорганизмом [5, 18, 113, 268, 288]. Так как часть протективных антигенов чумного микроба расположена в поверхностных структурах клеток, была получена серия препаратов КО, и F1 *Y. pestis*, которые были использованы в дальнейшем для создания искусственных антигенных комплексов. Учитывая особенность возбудителя чумы, подавлять реакцию врожденного иммунитета, для повышения эффективности комплексных препаратов были использованы адъюванты, препарат суммарной ДНК вакцинного штамма, МДП, арабиногалактан [73, 101, 128, 252]. Которые являются PAMPs, обладают способностью стимулировать специфические PRRs рецепторы, такие как Toll-подобные рецепторы –TLRs 2, 4, 9 и NLRs 2 (Toll-like receptors (TLR), NOD-like receptors (NLR)), и повышать резистентность макроорганизма [215, 217, 278, 289].

Таким образом, несмотря на значительные достижения в изучении иммуногенеза чумы и факторов вирулентности *Y. pestis*, участие искусственно созданных антигенных комплексов на основе клеточных оболочек (КО) и очищенных протективных антигенов чумного микроба в сочетании с адъювантами при формировании резистентности организма к чумной инфекции остается не до конца изученным. С учетом сведений из литературы о проявлении протективных свойств КО в комплексе с F1 *Y. pestis*, можно предположить, что эти антигены играют определенную роль в стратегии выживания чумного микроба в макроорганизме.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Штаммы бактерий

В работе были использованы штаммы *Yersinia pestis* И–2638, *Yersinia pestis* И-2683 и *Yersinia pestis* EV эталонной линии НИИЭГ (коммерческая вакцина живая сухая – ЖЧВ). Указанные штаммы *Y. pestis* хранились в лиофилизированном состоянии в коллекции музея живых культур ФКУЗ Иркутский научно–исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Таблица 1).

Штаммы чумного микроба, используемые в работе, выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при 28 °С и 37 °С в течение двух суток.

Для культивирования использовали агар и бульон Хоттингера (рН 7,2), 3 % кровяной агар (рН 7,2), казеиново-дрожжевую среду (агар КД, рН 7,2) и минимальные питательные среды определенного состава [1, 5, 80, 82]. Качество питательных сред и свойства культур чумного микроба определяли согласно соответствующим методическим рекомендациям и указаниям [26, 35, 41, 46, 48, 63]. Все штаммы обладают характерными для чумного микроба культурально-морфологическими и биохимическими свойствами. Их паспортные данные представлены в таблице 1.

Штаммы *Y. pestis* EV, *Y. pestis* И–2638, *Y. pestis* И–2683 использованы для заражения и иммунизации экспериментальных животных, а также постановки реакций фагоцитоза [76, 77].

Из клеток вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV, были получены КО и F1, а так же препарат суммарной ДНК [10, 30, 43, 58].

Таблица 1 – Паспортные данные штаммов *Y. pestis*

	Штаммы		
	<i>Y. pestis</i> EV НИИ-ЭГ (№ 229)	<i>Y. pestis</i> И–2683 (15–Д)	<i>Y. pestis</i> И–2638 (1025)
От кого выделен	Человек (бубонная форма)	Блохи <i>Neopsylla setosa</i> из нор малого суслика	Длиннохвостый суслик
Дата выделения	1926 г.	1970 г.	1977 г.
Место выделения	О. Мадагаскар, г. Тананарива	Малгобекский район республика Ингушетия, Малгобекский эпитотряд, с. Ачалуки	Монгун-Тайгинский район, республика Тыва, Монгун-Тайгинский природный очаг
Морфология роста на агаре Хоттингера	R-форма	R-форма	R-форма
Характер роста на бульоне Хоттингера	Бульон прозрачный на дне осадок	Бульон прозрачный на дне осадок	Бульон прозрачный на дне осадок
Морфология. Мазок	Полиморфные палочки	Короткие палочки	Короткие палочки
Отношение к окраске по Граму	грамотрицательные	грамотрицательные	грамотрицательные
Подвижность, рост на 0,3 % агаре	Рост по уколу, неподвижны	Рост по уколу, неподвижны	Рост по уколу, неподвижны
Лизис бактериофагами (чумной Покровского, Л413С, псевдотуберкулезный)	+	+	+
Str-чувствительность	+	+	+

2.2 Экспериментальные животные

Экспериментальными моделями в опытах (заражение, иммунизация, отбор проб крови, получение фагоцитов и т.д.) были морские свинки массой 300–350 г и белые беспородные мыши массой 18–20 г обоих полов. В работе использовались здоровые животные, полученные из питомника ФКУЗ Иркутский научно-

исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (РД 42-26-3...3738, НПО «Вектор», Новосибирск). Биомоделей содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды, в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Всего в опытах использовано животных: 97 – морских свинок, 2824 – белых мышей. Кроликов породы «Шиншилла» обоих полов 10. Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», Приложение № 4 [44], СП 1.3.1285-03, «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях» (2010), Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях (Страсбург, 1986).

Количество животных для опыта подбирали с учетом получения статистически достоверных результатов. Для каждого срока наблюдения во всех сериях эксперимента материал брали от 5 – 12 морских свинок или белых мышей.

Токсичность экспериментальных образцов антигенных препаратов определяли на 65 белых мышах. При определении протективной активности препаратов КО и F1 было использовано 278 беспородных белых мышей. В эксперименте по изучению протективной активности комплексов клеточных стенок и капсульного антигена *Y. pestis* EV было использовано 39 беспородных белых мышей. В опыте по определению протективной активности комплекса клеточных оболочек и F1 *Y. pestis* EV в сочетании с иммуномодуляторами было использовано 744 беспородных белых мыши. Опыты по изучению функционального состояния фагоцитов проведены с использованием 64 сертифицированных белых мышей. Влияние субклеточных фракций чумного микроба на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками белых мышей изучалась на 72 сертифицированных белых мышей. Влияние субклеточных фракций чумного микроба на субпопуляционный состав лимфоцитов крови белых мышей изучалась на 150 сертифицированных животных. Для получения макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов, и лимфоцитов и др., были использованы 97 – морских свинок. Для получения антисывороток использовали 5 кроликов массой 3,0-3,5 кг породы «Шиншилла» обоих полов.

Эксперименты проводили в двух повторах. В качестве контроля использовали клетки интактных животных.

2.3 Химические реактивы, диагностические препараты и иммуномодуляторы

В работе были использованы химические реактивы с маркировками «осч», «хч», «ultra pure grade», «research grade», «analytical grade», «molecular biology tested» отечественного и импортного производства. Фирмы-производители используемых реактивов указаны в соответствующих разделах при описании методик.

В ходе исследований использованы следующие диагностические препараты: чумной эритроцитарный антигенный, чумной эритроцитарный иммуноглобулиновый и коммерческие наборы ингредиентов для серологических реакций (производство НИИ микробиологии МО РФ, г. Киров). Также, на основе гипериммунных противочумных кроличьих сывороток, сотрудниками Иркутского НИПЧИ были сконструированы тест-системы для обнаружения антигенов чумного микроба в дот-иммуноанализе с частицами коллоидного серебра в качестве маркеров специфических антител.

Исследование серологическим методом проводили согласно действующим инструкциям [29, 57, 147].

В работе использовали также следующие иммуномодуляторы: мурамилдипептид (МДП) – N-acetylmuramyl-L-alanil-D-isoglutamine («Calbiochem»), арабиногалактан (АГ) из лиственницы сибирской (Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского).

2.4 Получение субклеточных фракций и антигенов чумного микроба, создание искусственного антигенного комплекса

В качестве источника антигенов использовали штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ. Культуру выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2), или на 3 % кровяном агаре Хоттингера (рН 7,2) при 37 °С и 28 °С в течение 48 часов, смывали забуференным физиологическим раствором с приготовлением суспензии 10⁹ КОЕ/мл. Обработку культуры проводили при комнатной температуре, а так же в сочетании с прогре-

ванием [24, 28, 33, 34, 72, 80]. Для подбора оптимальных условий обеззараживания клеток чумного микроба, а так же для получения субклеточных фракций чумного микроба, обладающих иммуногенными свойствами опробованы различные варианты обработки бактериальной взвеси [43, 58, 59].

В одном случае к микробной взвеси добавляли равный объем стерильного 9 М раствора мочевины («Serva»). Для усиления бактерицидного воздействия раствора мочевины были испытаны добавки в виде 1 % саркозината натрия или 1 % уксусной кислоты.

В другом случае к клеточной суспензии добавляли равный объем раствора цетавлона (СТАВ, Cetyltrimethylammonium bromide, «Serva») 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 %, 0,0625 % концентрации. Суспензию выдерживали от 1 часа до 5 суток, периодически окрашивали мазки по Романовскому и Граму. В том и другом случае эффективность обработки проверяли согласно «Инструкции по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов» (Саратов, 1982).

С целью освобождения от не разрушенных клеток обеззараженную бактериальную суспензию центрифугировали в течение 20 мин на холоду при 6000 об/мин (центрифуга ОС-6М, Россия).

Фракцию клеточных стенок выделяли центрифугированием супернатанта в течение 30 мин при 4 °С и 16000 об/мин (центрифуга К 25 D, Janetzki, Германия). Осадок дважды отмывали в дистиллированной воде и лиофильно высушивали. Для снижения токсичности суспензию клеточных оболочек (в концентрации 2 мг/мл) обрабатывали 0,1 % раствором дезоксихолата натрия в течение 10 мин при комнатной температуре.

Капсульный F1 антиген чумного микроба получали из супернатанта, после выделения клеточных стенок. Из цетавлоновых экстрактов клеток чумного микроба, выращенных при 37 °С, выделяли фракцию I путем изоэлектрического осаждения (рН 4,6-4,7) в комбинации с высаливанием сульфатом аммония, а из мочевиновых экстрактов – с изоэлектрическим осаждением (рН 4,3) в комбинации с

высаливанием сульфатом аммония. Затем F1 антиген перерастворяли и лиофильно высушивали [4, 43, 58, 59].

ЛПС получали по методу В.И. Вейнבלата, экстрагируя ацетонвысушенные клетки чумного микроба водно-фенольной смесью [5, 58, 291].

Искусственные антигенные комплексы получали за счет механического смешивания клеточных оболочек и F1 *Y. pestis* EV в соотношении 1:1 по сухому весу.

Комплексы на основе антигенов чумного микроба получали, смешивая 5,60 мг клеточных стенок с 6,25 мг капсульного антигена в 2,5 мл физиологического раствора и обрабатывая ультразвуком на дезинтеграторе «MSE-150 Watt» (Англия) при 20 кГц 3-4 циклами по 5-7 секунд в ледяной бане. В полученную суспензию осторожно, по каплям, при легком встряхивании добавляли 2,5 мл 5 % раствора глутарового альдегида. Смесью перемешивали в течение 3 ч при 37 °С и далее интенсивно диализовали против стерильного физиологического раствора (2 сут, 4 °С) с многократной сменой буфера.

Приготовление коллоидного золота и его комплексов с антигенами чумного микроба осуществляли следующим образом. 100 мл 0,01 %-ного раствора золотохлористоводородной кислоты доводили до кипения, добавляли 300 мкл 10 %-ного раствора цитрата натрия. Смесью кипятили в течение 10 мин до появления интенсивного вино-красного цвета. После охлаждения рН золя золота доводили 0,2 М раствором K_2CO_3 до 7,6. К 1,5 мл золя золота добавляли 1 мл антигенного препарата, полученного суспендированием 6,25 мг клеточных стенок в дистиллированной воде с 6,25 мг капсульного антигена, обработанного ультразвуком на дезинтеграторе «MSE-150 Watt» (Англия) при 20 кГц 3-4 циклами по 5-7 секунд в ледяной бане. Полученную суспензию встряхивали 20 мин при комнатной температуре и хранили при 4 °С до использования [43, 83].

Препарат суммарной ДНКт получали из клеток *Y. pestis* EV, выращенных на агаре Хоттингера (рН 7,2), в течение 18 часов при 37 °С. Культуру смывали забуференным физиологическим раствором, суспензию бактериальных клеток лизи-

ровали раствором, содержащим 1 % цетавлона, 0,1 М ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), 2 М NaCl и 5 М мочевины, рН 8, инкубировали в течение 10 мин. при 50 °С. После контроля специфической стерильности лизата выделяли ДНКт по В. И. Нактинису с соавт. [10]. Лизат депротеинизировали равным объемом смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1). После экстракции осаждали цетавлоновую соль ДНК 20 % раствором цетавлона и 5 М мочевиной. Осажденную ДНК промывали 1М ацетатом натрия (Serva) в 70 % этаноле, а так же 70 % этанолом, высушивали, растворяли в TE буфере. Дополнительную очистку препарата ДНКт проводили по Т. Маниатису с соавт. [30]. Препарат обрабатывали протеиназой К (СибЭнзим, Россия) и рибонуклеазой-1 (СибЭнзим, Россия) (60 мин при 37 °С), проводили экстракцию фенолом, хлороформом и изоамиловым спиртом, а также осаждение 3 М ацетатом натрия и этанолом. Осадок дважды промывали 70 % этанолом и лиофильно высушивали.

2.5 Аналитические методы

2.5.1 Химические и физико-химические методы

Концентрацию белка определяли по методам М. М. Bradford [132] и О. Н. Lowry с соавт. [254] или в их модификациях по оптической плотности растворов при длине волн 595 нм и 650 нм соответственно [248, 295]. Концентрацию белка в исследуемом растворе определяли по стандартной калибровочной кривой, для построения которой использовали водные растворы бычьего сывороточного альбумина известной концентрации. Содержание гексоз – в реакции с фенолом [80] после гидролиза препаратов в 2 N растворе H₂SO₄ (2 ч, 95 °С), оптическую плотность измеряли при 490 нм (максимум поглощения гексоз), КДО – в реакции с тиобарбитуровой кислотой [80] после гидролиза в 0,02 N растворе H₂SO₄ (20 мин, 100 °С) и периодатного окисления, мурамовой кислоты – в реакции с гидроксидифениловым реагентом [187]. Суммарное количество нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически по методу А. С. Спирина [69] с предварительным удалением на холоду кислоторастворимых (0,5 N раствор HClO₄) компонентов из анализируемого материала и по методу L. Wu с соавт. [291] по оптиче-

ской плотности растворов антигенов при 260 нм в 0,1 N растворе NaOH. Чистоту препарата ДНК оценивали по отношению поглощений при длинах волн 260 нм/280 нм. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометрах СФ-26 Ломо (Россия) и Nanovue (GE Healthcare).

Электрофоретический анализ белков проводили по методу U.K. Laemmli [221, 222, 280] в блоках полиакриламидного геля (ПААГ), состоящего из концентрирующего и разделяющего гелей с использованием трис-глицинового электродного буфера. Концентрирующий гель состоял из 4 % акриламида (Sigma); 0,1 % бис-акриламида (Sigma); разделяющий гель: 7,5–15 % акриламида; 0,4 % бис-акриламида; с последующей окраской на белки кумасси ярко-синим R-250 (Serva) [175] и ЛПС ионами серебра [282]. Молекулярную массу полипептидов оценивали по калибровочной кривой, построенной с использованием набора маркерных белков № 4 и № 5 (Serva), а так же набора маркерных белков 6–200 кДа (Sigma).

Чистоту и гомогенность полученного препарата ДНК оценивали в электрофорезе в агарозном геле (Sigma) (0,5–1,0 % агарозы) с трис-боратным буфером, при 50 мА в течение 3-4 часов, гели окрашивали красителем бромистым этидием (Ethidium bromide, Serva), по Т. Маниатису с соавт. [30], с использованием набора ДНК-маркеров («Fermentas» Латвия). Для нанесения проб использовали 6 × буфер содержащий: 0,25 % ксилолцианола, 0,25 % бромфенолового синего, водный 30 % раствор глицерина.

Электрофоретический анализ проводили в камерах для проведения горизонтального и вертикального электрофореза фирмы «Bio-Rad», результаты детектировали с помощью Gel Doc XR+ Imaging System (Bio-Rad).

2.5.2 Иммунохимические методы исследования

Наличие антигенов *Y. pestis* EV в полученных препаратах и фракциях, а так же активность полученных иммунных сывороток определяли в реакции иммунодиффузии (РИД), иммуноферментном анализе (ИФА), так же по результатам иммунохроматографических тестов «ИХ тест *Y. pestis*» (ФГУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск), полученных с использованием моноклональных антител против F1-антигена.

РИД проводили методом Оухтерлони [246] в чашке Петри в 1 % агаровом геле на фосфатном буфере, рН 7,2 с 0,1М NaCl с последующей окраской на белки кумасси ярко-синим (Serva).

ИФА проводили в трех вариациях метода: твердофазном иммунном анализе, дот-иммуноанализ и иммуноблотинге. Для постановки твердофазного иммунного анализа использовали 96-луночные микропланшеты. Для проведения дот-иммуноанализа и иммуноблотинга использовали нитроцеллюлозные мембраны (Synpor), а так же нитроцеллюлозные фильтры Trans-Blot Transfer Medium (Bio-Rad) с диаметром пор 0,45 мкм. Иммуноблоттинг проводили по методу Н. Towbin с соавт. [280], электрофоретически разделенные препараты переносили из ПААГ на нитроцеллюлозные фильтры с помощью электропереноса при 60 мА в течение 60–120 мин. После иммобилизации антигенов свободные места на нитроцеллюлозных фильтрах нейтрализовали 3 % бычьим сывороточным альбумином (БСА, Sigma, США).

Дот-иммуноанализ проводил для обнаружения антигенов *Y. pestis* и антител к ним, с помощью этого метода, были сконструированы конъюгаты с использованием в качестве маркеров частиц коллоидного серебра. Также был проведен Дот-иммуноанализ с использованием специфических антител, меченых дисперсным красителем «Dianix luminous red B» (DyStar, Германия). Конъюгаты создавались на основе специфических IgG и антигенов чумного микроба (ЛПС, F1). Испытание конъюгатов на пригодность, для обнаружения корпускулярных антигенов чумного микроба, показало что, чувствительность дот-иммуноанализа составляет $\geq 10^5$ м. к./мл. Наиболее специфичным конъюгатом оказался препарат на основе IgG антисывороток, полученных против F1 чумного микроба. В дальнейшем его использовали для иммунохимического скрининга антигенных препаратов, выделенных из клеток *Y. pestis* EV.

Антигены выявляли с помощью специфических антител, источником которых служили гипериммунные кроличьи сыворотки, полученные иммунизацией животных F1-антигеном, а также поливалентные сыворотки, полученные после

иммунизации кроликов вакцинным штаммом *Y. pestis* EV. Приготовление коллоидного серебра и его комплексообразование со специфическими IgG осуществляли по методу А. Г. Полтавченко с соавт. [57]. Антигены выявляли так же с использованием мышинных моноклональных антител против капсульного антигена чумного микроба (ФГУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск) и коммерческим конъюгатом антивидовым иммунопероксидазным (против IgG мыши) МТО «Инициатива» (г. Щелково).

2.6 Определение протективной активности

Протективную активность изолированных субклеточных фракций чумного микроба изучали на белых беспородных мышах обоих полов весом 18–20 г, по 5 особей на 1 дозу препарата, с заражением через 21 сутки вирулентным штаммом *Y. pestis* И-2683 в дозе 200 Dcl ($2 \cdot 10^3$). Препараты клеточных стенок вводили однократно в дозе 3,9–125,0 мкг, капсульного антигена – 7,8–1000 мкг, комплексный препарат, состоящий из смеси равных количеств капсульного антигена и клеточных оболочек, в дозе от 3,9 до 62,5 мкг (количество вводимого животным материала рассчитывалось по сухому весу). Контрольной группой служили не иммунизированные и иммунизированные подкожно в дозах 10^4 – 10^7 м. к. вакцинным штаммом *Y. pestis* EV животные. Гибель животных учитывали в течение 23 суток после заражения. Подсчет величины иммунизирующей дозы, вызывающей защиту 50 % взятых в опыт животных (ИД₅₀), осуществляли по формуле Кербера, а также по методу Рида и Менча с оценкой доверительных интервалов по формуле Пицци [66]. В ряде случаев протективную активность препаратов оценивали по критерию χ^2 [3, 11, 64].

2.7 Определение острой токсичности

Острую токсичность, полученных препаратов определяли на белых беспородных мышах весом 18–20 г. при однократном подкожном введении в дозах от 0,125 до 1 мг (по сухому весу). Учет результатов проводили в течение 7 суток после инъекции. Расчеты параметров летального эффекта (LD₅₀) проводили общепринятыми биометрическими методами [3, 11, 64].

2.8 Получение макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов

В ходе предварительных исследований нами отработаны и, в большинстве случаев, оптимизированы методы получения полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ) и перитонеальных макрофагов (ПМ), которые, в конечном итоге, сводятся к следующему [76, 77].

Резидентные ПМ получали в соответствии с двумя методическими приемами.

В первом случае объектом для выделения макрофагов служили интактные морские свинки. Перитонеальный экссудат вместе с клетками, в норме заселяющими брюшную полость, вымывали средой 199, разведенной 1:10 ЗФР рН 7,2 [76, 77].

Во втором случае морским свинкам за 8–9 сут до отбора материала внутрибрюшинно вводили 5 % раствора пептона или по 10 мл стерильного вазелинового масла (ГОСТ 3164-78). Клетки вымывали цитратно-солевым раствором (26 мл насыщенного раствора хлористого натрия (ГОСТ 4233-77, ч.д.а.) и 4 г лимоннокислого натрия (ТУ 6-09-2248-77, х.ч.) на 1 л H₂O), стерилизованным при 120 °С в течение 30 мин. Отобранный в охлажденные пробирки перитонеальный экссудат центрифугировали в течение 5 мин при 1000 g, осадок макрофагов отмывали двукратно средой 199, разведенной 1:10 ЗФР, путем центрифугирования при 1000 g в течение 5 мин. Отмытые клетки ресуспендировали в среде 199. Количество макрофагов учитывали в камере Горяева.

От одной морской свинки без предварительной стимуляции получали до 20 – 30·10⁶ кл/мл, после стимуляции вазелиновым маслом или 5 % раствором пептона – до 100 – 120·10⁶ кл/мл (и более) макрофагов [76, 77].

Перитонеальный экссудат морских свинок служил источником ПЯЛ, его получали по общепринятой методике [76]. Для стимуляции процесса накопления и вымывания ПЯЛ животным внутрибрюшинно вводили солевой раствор в коли-

честве 50 мл (26 мл насыщенного раствора хлористого натрия на 1 л H₂O), через 240 мин таким же образом вводили 40 мл цитратно-солевого раствора. Для получения ПЯЛ в больших количествах животных предварительно стимулировали путем внутрибрюшинной инъекции 20 мл 5 % раствора пептона. Экссудат вымывали из брюшной полости через 14 ч стерильным цитратно-солевым раствором. От одной морской свинки таким способом можно получить до $1 \cdot 10^9$ кл/мл. Состав экссудата представлен: $(84,0 \pm 3,0)$ % ПЯЛ, $(11,0 \pm 1,0)$ % макрофагов, также встречаются лимфоциты и эозинофилы. Число фагоцитов подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток оценивали по методу окрашивания погибших клеток метиловым синим [76, 77].

Полученную взвесь клеток хранили на льду в пробирках.

Для получения лимфоцитов к 5,0 мл гепаринизированной крови (10 ед/мл) прибавляли 0,5 мл 1 % раствора желатина, приготовленного на среде 199, инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Суспензию центрифугировали при 1500 g в течение 12 мин, затем осадок клеток дважды (в течение 7 мин при 1500 g) отмывали от желатина средой 199, клетки ресуспендировали в 1 мл среды 199.

Полученные клетки подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность фагоцитов оценивали на проточном цитофлуориметре или в тесте с трипановым синим. Для этого к 50 мкл суспензии клеток добавляли 5 мкл 7-амино-актиномицина (7-AAD), инкубировали на льду в течение 5–15 мин, доводили полученную суспензию раствором фосфатно-солевого буфера до 0,4 мл и проводили подсчет живых клеток на цитометре. Содержание мертвых клеток не должно было превышать 10 % [47, 76, 77].

2.9 Определение фагоцитарной активности макрофагов

Для изучения активности фагоцитов в отношении чумного микроба (*Y. pestis* EV) использовали перевиваемую однослойную культуру перитонеальных макрофагов морской свинки, которую получали по общепринятой методике [76, 77]. Соотношение макрофагов и микробов в реакции фагоцитоза составило 1:50. Макрофагально-микробную взвесь наносили на хорошо обезжиренные предметные стек-

ла, помещали во влажную камеру при повышенном до 5 % содержании CO₂, инкубировали 60–180 мин при температуре 37 °С и отмывали. Монослой макрофагов по завершении опыта фиксировали в течение 20 мин в смеси Никифорова и окрашивали по Романовскому-Гимза. Препараты просматривали в световом микроскопе, иммерсионном объективе.

Для оценки интенсивности фагоцитоза определяли следующие показатели:

- фагоцитарное число – среднее количество микробов, которые были поглощены одним фагоцитом;
- процент активных фагоцитов – количество фагоцитарно активных макрофагов на 100 сосчитанных;
- цитопатическое действие бактерий – число макрофагов, разрушенных и поврежденных, на 100 изученных клеток;
- процент завершенности фагоцитоза, рассчитывали по формуле:

$$\frac{\Phi_{30\text{мин}} - \Phi_{180\text{мин}}}{\Phi_{30\text{мин}}} \times 100,$$

где: $\Phi_{30\text{мин}}$ – фагоцитарное число через 30 мин контакта макрофагов с микробами;

$\Phi_{180\text{мин}}$ – фагоцитарное число через 3 ч контакта макрофагов с микробами.

При завершенном фагоцитозе значения будут положительными, а при незавершенном (размножение микробов в макрофагах) – отрицательными [14, 76, 77].

2.10 Определение метаболитов кислорода в фагоцитах

Активность кислородзависимого метаболизма (КЗМ) в моноцитах и полиморфноядерных лейкоцитах (ПЯЛ) крови морских свинок, иммунизированных препаратом КО и F1, как самостоятельно, так и в сочетании с ДНК, а также в сочетании с МДП, определяли с помощью НСТ-теста [247] в монослое клеток. Интенсивность окислительных процессов в клетках оценивали по цитохимическому показателю активности (ЦПА), выраженному в условных единицах и по проценту формазанположительных клеток (ФП). Контролем служили клетки крови интактных животных. Для постановки реакции на предметное стекло наносили инкубационную смесь которая включала по 30 мкл среды 199, фосфатного буфера рН 7,4

и 0,1 % раствора нитросинего тетразолия, и 30 мкл взвеси фагоцитирующих клеток, и помещали во влажную камеру при 37 °С с повышенным содержанием CO₂. Полученный монослой макрофагов промывали в среде 199 для удаления не прикрепившихся клеток, высушивали на воздухе. Мазки фиксировали в смеси Никифорова, высушивали на воздухе, окрашивали 1 % водным раствором метиленового зеленого. Окрашенные препараты исследовали под иммерсионной системой микроскопа. Макрофаги считали положительными по тесту восстановления нитросинего тетразолия в том случае, если они содержали глыбки темно-синего формазана. Из 100 просмотренных клеток выделяли:

0 группу – в цитоплазме клеток отсутствовали гранулы формазана (0a);

1 группу – клетки, которые содержали единичные гранулы формазана, или клетки, площадь окраски в которых занимала до 25–30 % цитоплазмы (1b);

2 группу – клетки, цитоплазма которых на 30–70 % была занята гранулами формазана (2c);

3 группу – клетки, до 100 % площади которых было заполнено гранулами формазана (3d).

Показатель НСТ-теста рассчитывали по формуле: $0a+1b+2c+3d$, где a, b, c, d – это количество клеток 0, 1, 2 и 3 групп, соответственно. ЦПА было рассчитано по методу L.C. Karlow [216].

2.11 Определение активности миелопероксидазы

Активность миелопероксидазы определяли по методу Пигаревского В.Е. [56]. Мазки крови или перитонеального экссудата морских свинок, получавших препарат КО и F1, как самостоятельно, так и в сочетании с ДНК, в сочетании с МДП, а так же интактных животных, фиксировали в спиртовом растворе формалина (19:1), промывали H₂O, наносили на них инкубационную смесь в составе: 24 мг о-диаминобензидина в 5 мл метилового спирта, до 9.5 мл – H₂O и 0.5 мл 3% раствора перекиси водорода. Окрашенные препараты цитофотометрировали на приборе ЛЮМАМ Р-8, апертура № 5, $\lambda = 406$ нм, зонде № 2 с помощью иммерсионного объектива микроскопа. Гранулы миелопероксидазы были окрашены в ко-

ричевый цвет. Об активности фермента судили по разности оптической плотности проб, опытной и контрольной, и выражали в условных единицах [76, 77].

2.12 Определение активности NO-синтазы

Макрофаги были получены по методу J. G. Hirsh [196]. Опыты проводили *in vitro*, время взаимодействия антиген-фагоцит составило 189 мин. В качестве контроля использовали интактные клетки. Продукцию NO в макрофагах определяли по методу L. C. Green с соавт. [104]. В качестве ингибитора NO-синтазы макрофагов был использован N-монометил-L-аргинин. В лунки микропланшета вносили по 100 мкл лейкоцитарно-микробной взвеси (1:50). Для построения калибровочной кривой в лунках параллельного ряда титровали раствор NaNO_2 , с начальной концентрацией 100 мкМ, в среде 199, разбавленной 1:10 ЗФР. Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 30 мин или 180 мин, затем в лунки добавляли по 200 мкл реактива Грисса, планшет инкубировали 10 мин комнатной температуре. Результаты регистрировали спектрофотометрически, при $\lambda = 450$ нм. Активность NO-синтазы рассчитывали по калибровочной кривой, выражали в количестве высвобожденной в ходе ферментативной реакции окиси азота (в мкМ/10⁶ фагоцитов) [104].

2.13 Определение содержания неферментных катионных белков

Содержание неферментных катионных белков (НКБ) в фагоцитах опытных и контрольных групп животных определяли цитофотометрически. Мазки крови или экссудата, фиксированные в течение 10–15 сек в спиртовом растворе формалина (19:1), промывали в двух сменах H₂O, погружали в забуференный спиртовый раствор прочного зеленого рН 8,15–8,20 на 60 мин при комнатной температуре. Препараты ополаскивали в двух сменах H₂O, высушивали. Окрашенные препараты цитофотометрировали на приборе ЛЮМАМ Р-8 при апертуре № 14, $\lambda = 619$ нм, зонде № 2. Гранулы катионных белков нейтрофильных, эозинофильных и базофильных гранулоцитов окрашивались в ярко зеленый цвет. Содержание неферментных катионных белков в ПЯЛ определяли по разнице оптической плотности проб, опытных и контрольной и выражали в условных единицах [56].

2.14 Методы выявления цитокинов

В качестве продуцента цитокинов использовали перитонеальные макрофаги как интактных так и иммунизированных подкожно морских свинок весом 250–300 г. Индуктором цитокинов служили клетки штамма *Y. pestis* EV (10^5 м. к.) *per se*. Контрольные животные получали 0,15 М апиригенный раствор NaCl. Длительность примирования клеток с *Y. pestis* EV составила 240 мин. По окончании срока инкубации супернатант получали центрифугированием культуральной жидкости при 1000 об/мин в течение 10 мин с последующим фильтрованием через фильтры Amicon диаметром пор 0,22 мкм. Полученные супернатанты содержали комплекс цитокинов, среди которых были идентифицированы, с помощью моноклональных антител (Caltag, Канада), цитокины IL-1, IL-6, TNF- α [76, 77].

2.14.1 Выявление цитокинов иммуноферментным методом

Для обнаружения цитокинов IL-1, IL-6, TNF- α , продуцированных перитонеальными макрофагами, была использована коммерческая тест-система на основе моноклональных антител (Calteg, Канада). В лунки 96-луночных микропланшетов, сенсibiliзированных антителами против индивидуальных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- α), вносили: в первую лунку 100 мкл суспензии перитонеальных макрофагов от интактных животных (контроль), во все остальные лунки в том же объеме исследуемый материал от иммунизированных животных (перитонеальные макрофаги). Далее в лунки добавляли по 25 мкл кроличьих поликлональных антител против индивидуальных мышинных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- α), инкубировали при комнатной температуре в течение 180 мин. После этого лунки планшета промывали 5-кратно ЗФР, после чего в каждую лунку вносили по 50 мкл конъюгата козьих антикроличьих антител, меченных щелочной фосфатазой. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 45 мин, лунки отмывали 5-кратным ЗФР и затем в каждую из них вносили по 200 мкл субстрата. Через 10 мин инкубации (при комнатной температуре) реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 50 мкл 0,5 М раствора серной кислоты. Результаты реакции

учитывали на приборе ELx808U при $\lambda=490$ нм, за вычетом контрольных значений, и выражали в пг/10⁷ клеток.

2.14.2 Выявление цитокинов методом проточной флюориметрии

Анализ содержания 21 цитокина: 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, 7 и 21 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, Calibration Bead Set. Обработку данных проводили с помощью программы Bio-Plex Manager 5.0 Properties. Концентрацию цитокинов в плазме крови выражали в пкг/мл [7, 9, 42, 75].

2.15 Определение фенотипа клеток крови

Материалом для исследования являлись лимфоциты, выделенные из гепаринизированной крови беспородных белых мышей 18 – 20 г обоих полов (сертифицированные, НПО «Вектор», г. Новосибирск). Кровь отстаивали до четкого разделения эритроцитов и плазмы на льду, в течение 40–60 мин. Отбирали плазму и верхний слой эритроцитов, центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 5 мл лизирующего буфера (BD Biosciences, Oxford, UK), инкубировали 5 мин на льду, отмывали при 1000 об/мин в течение 2 мин, затем доводили до концентрации $2 \cdot 10^7$ кл/мл фосфатно-солевым буфером. Жизнеспособность клеток составляла 96–98 %, в тесте с трипановым синим.

Суспензию лимфоцитов в концентрации $2 \cdot 10^7$ кл/мл раскапывали в полистироловые пробирки по 50 мкл (10^6 клеток), добавляли соответствующую концентрацию титруемого антитела (Таблица 2).

Пробы инкубировали на льду в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Затем в каждую пробирку добавляли по 1–2 мл контрастирующего буфера (BD Pharmingen Stain (BSA)), осторожно перемешивали, центрифугировали

при 1000 g в течение 5 мин при 4 °С. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 0,5 мл контрастирующего буфера.

Таблица 2 – Схема подготовки проб для титрования антител

Реагент	№ пробирки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Объем реагента, мкл							
Суспензия лимфоцитов	50	50	50	50	50	50	50	50
Антитело	0,5	0,7	1	2	4	6	8	–
Антитело изотипического контроля	0,5	0,7	1	2	4	6	8	–

Проводили настройку оптимального напряжения фотоумножителей для SSC и FSC на проточном цитофлуориметре, собирали 10 000 событий для каждой пробирки.

Общий объем раствора антител, необходимый для проведения анализа «n» проб (O_p), рассчитывали по формуле $O_p = n \times 50$ мкл, где n – число проб. Общий объем рабочего разведения для каждого реагента (FITC CD3, APC-Cy7 CD8, O_3 , O_4 , O_8), содержащий оптимальное количество антител, необходимое для окрашивания n образцов рассчитывали с учетом рабочего объема реагентов (таблица 1) умноженное на число n. Общий объем реагентов был рассчитыван по формуле: $O_k = O_1 + O_2 + \dots + O_8$.

Объем контрастирующего буфера (O_{KB}), необходимого для разведения общего объема реагентов (O_k), был рассчитыван по формуле: $O_{KB} = O_p - O_k$ и добавлен в пробирку, содержащую O_k .

Фенотип лимфоцитов определяли с использованием моноклональных антител (Becton Dickinson, США) в панели: CD45-PE-Cy5/CD3-FITC/CD4-Alexa700/CD8-APC-Cy7/CD25-PE-Cy7/ IL-1 α -PE/ IL-4-APC. Анализ окрашенных образцов провели на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США) в программе BD Diva 6.0.

Клетки в концентрации $2 \cdot 10^5$ инкубировали с антигеном чумного микроба в течение 3 часов. По истечении времени инкубации к клеткам добавляли 50 мкл раствора O_p , и инкубировали 30 мин. Затем добавляли 0,5 мл ЗФР с 0,5 % бычьим

сывороточным альбумином (BCA, Gerbu, Германия), 0,1 % NaN_3 , центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин, осадок клеток ресуспендировали в 0,5 % Permeabilizing Solution (BD Biosciences, США), инкубировали 15 мин. После этого добавляли 0,5 мл ЗФР с BCA и NaN_3 , центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Затем добавляли 50 мкл раствора антитела для окрашивания внутриклеточных цитокинов, состоящего из PE Hamster Anti-Mouse IL-1 α и APC Rat Anti-Mouse IL-4, инкубировали 30 мин, отмывали при 1000 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 450 мкл 1 % параформальдегида. Анализ окрашенных образцов проводили на проточном цитофлуориметре в программе BD Diva 6.0. В каждой пробе анализировалось по 10 000 событий.

Популяции моноцитов, лимфоцитов идентифицировали на основе комбинации SSC и CD45 на графике DotPlot. Для изучения Т-клеточного звена определяли следующие субпопуляции: активированные Т-лимфоциты ($\text{CD3}^+\text{CD25}^+$), активированные Т-хелперы ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$), активированные цитотоксические Т-лимфоциты ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD25}^+$), регуляторные Т-лимфоциты ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$), и Т-хелперы, синтезирующие IL-4 ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IL-4}^+$). Для изучения моноцитарного звена оценивали активированные моноциты (CD25^+), а так же моноциты, содержащие IL -1 α [216, 247].

Субпопуляционный состав клеток крови мышей был определен методом шестипараметрического фенотипирования с использованием реагентов фирмы Becton Dickinson (США): CD45-PE-Cy5, CD3-FITC, CD4-Alexa-700, CD8-APC-Cy7, CD25-PE-Cy7, CD19-APC.

В пробирки BD Trucount™ Tubes (BD Biosciences, Oxford, UK) раскапывали по 50 мкл гепаринизированной крови. Параллельно ставили пробирку аутофлуоресцентного контроля, содержащую 50 мкл гепаринизированной крови и 50 мкл ЗФР. Затем в каждую пробирку с опытным образцом добавляли по 50 мкл O_p , пробирки встряхивали. Инкубировали в течение 30 мин при 4 °C. По истечении времени эритроциты лизировали добавлением 0,5 мл разведенного 1:10 FACS Lysing Solution.

Абсолютное количество клеток подсчитывали по формуле:

$$\frac{K \times \text{KBeads}_{\text{уп}}}{\text{KBeads} \times V},$$

где K – количество клеток, зарегистрированных прибором; $\text{KBeads}_{\text{уп}}$ – количество частиц в пробирке (на упаковке); KBeads – количество частиц, зарегистрированных прибором; V – объем пробы (50 мкл).

Субпопуляционный состав клеток крови мышей определяли методом пяти-параметрического фенотипирования с использованием реагентов фирмы Becton Dickinson (США) в панели: CD45-PE-Cy5, CD3-FITC, CD4-Alexa-700, IL-1 α -PE, IL-4-APC.

В пробирки BD Falcon™ 12x75 мм раскапывали по 100 мкл гепаринизированной крови. Затем добавляли 50 мкл O_p (CD45, CD3, CD4) и инкубировали в течение 30 мин при 4 °С. Параллельно ставили аутофлуоресцентный контроль, вместо антител добавляли 50 мкл ЗФР. По истечении времени в пробирки добавляли 1–2 мл лизирующего буфера FACS Lysing Buffer (BD Biosciences, США) и инкубировали в течение 15 мин при 4 °С. Затем образцы центрифугировали в течение 5 мин при 1000 g, далее полученный осадок ресуспендировали в 0,5 мл BD FACS Permeabilizing Solution (BD Biosciences, США) и инкубировали 15 мин при 4 °С. После этого добавляли 0,5 мл ЗФР с 0,5 % БСА и 0,1 % NaN₃, центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Затем добавляли по 50 мкл раствора антител для окрашивания внутриклеточных цитокинов, состоящего из PE Hamster Anti-Mouse IL-1 α и APC Rat Anti-Mouse IL-4, инкубировали 30 мин, отмывали при 1000 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 450 мкл 1 % параформальдегида. Анализ окрашенных образцов был проведен на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II в программе BD Diva 6.0. В каждой пробе анализировалось по 10 000 событий.

Для идентификации лейкоцитов, моноцитов и лимфоцитов использовались моноклональные антитела к CD45 в сочетании с боковым светорассеянием (SSC).

Количество активированных В-, Т-лимфоцитов определяли от общего числа лимфоцитов. Дополнительно вычисляли иммунорегуляторный индекс ($CD4^+/CD8^+$), лейко-Т-клеточный (лейкоциты/ $CD3^+$) и лейко-В-клеточный индекс (лейкоциты/ $CD19^+$).

2.16 Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами, рассчитывая среднеарифметические величины, их средние ошибки, доверительный интервал, достоверность различий по критерию Стьюдента. Для статистической обработки данных применялся также стандартный пакет прикладных программ «Statistica», версия 6 (Copyright©StatSoft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897) с использованием U-критерия Манна-Уитни. Достоверными считались различия при уровне значимости $P < 0,05$. При определении химического состава препаратов ошибка измерения не превышала 5 %, в работе представлены данные типичных опытов [3].

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Получение субклеточных фракций и антигенов чумного микроба, создание искусственного антигенного комплекса

Поверхностные структуры бактериальной клетки грамотрицательных бактерий (капсула, S-слои, наружная мембрана, клеточная стенка и оболочки бактериальной клетки в целом) играют определяющую роль во взаимодействии микроба с макроорганизмом, в них сосредоточен наиболее важный антигенный материал (липополисахариды, белки наружной мембраны, пептидогликан и т. п.). Как правило, изоляцию клеточных оболочек и антигенов осуществляют из убитых формалином, фенолом или кипячением патогенных бактерий с последующим механическим разрушением клеток, что неизбежно сопровождается снижением иммуногенных свойств получаемых субклеточных фракций.

Для получения субклеточных фракций с максимальным сохранением иммуногенных свойств, как это было установлено в отношении холерного вибриона [31], была изучена возможность обеззараживания бактериальной массы *Y. pestis* EV растворами мочевины и цетавлона. Для усиления бактерицидного воздействия раствора мочевины были также испытаны добавки в виде 1 % саркозината натрия или 1 % уксусной кислоты.

Штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ использовали в качестве источника антигенов. Культуру выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2), а так же на 3 % кровяном агаре Хоттингера (рН 7,2) при 37 °С и 28 °С в течение 48 часов, смывали забуференным физиологическим раствором с приготовлением суспензии 10⁹ КОЕ/мл. Обработку культуры проводили как при комнатной температуре, так и в сочетании с прогреванием [24, 28, 33, 34, 72, 80]. Для подбора оптимальных условий обеззараживания клеток чумного микроба, для получения субклеточных фракций чумного микроба, обладающих иммуногенными свойствами были опробованы различные варианты обработки микробной взвеси [43, 58, 59].

В первом случае к бактериальной взвеси обеззараживали равный объем стерильного 9 М раствора мочевины («Serva»). Для усиления бактерицидного воздействия раствора мочевины были испытаны добавки в виде 1 % саркозината натрия или 1 % уксусной кислоты.

Во втором случае к клеточной суспензии добавляли равный объем раствора цетавлона (СТАВ, Cetyltrimethylammonium bromide, «Serva») 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 %, 0,0625 % концентрации. Суспензию выдерживали от 1 часа до 5 суток, периодически окрашивали мазки по Романовскому и Граму. В том и другом случае эффективность обработки проверяли согласно «Инструкции по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов» (Саратов, 1982).

В результате проведенных исследований установлено, что растворы цетавлона (в конечной концентрации 0,0625 % и выше), мочевины (в конечной концентрации 3 М и выше) как с добавками, так и без добавок уксусной кислоты или саркозината натрия (саркозила) обладают бактерицидным и лизирующим действием в отношении клеток вакцинного штамма чумного микроба и могут быть использованы для получения и одномоментного обеззараживания различных фракций поверхностных антигенов.

При наблюдении в световой микроскоп окрашенных мазков уже через час, под воздействием указанных растворов, отмечалось снижение тинкториальных свойства культуры, через 24 часа в мазках регистрировалось небольшое количество слабо окрашиваемых целых клеток, через 48 часов – наличие целых клеток не отмечалось. По результатам контроля специфической стерильности оптимальное время отдельного воздействия мочевины и детергента для инактивации микробных клеток составляло двое суток. Комплексное воздействие мочевины и детергента в сочетании с прогреванием оказывало практически мгновенное инактивирующее воздействие на *Y. pestis* EV (Патент РФ № 2248217) [47, 63].

Бактерицидное действие раствора мочевины проявлялось во всех вариантах постановки эксперимента.

При использовании цетилтриметиламмоний бромиды у растворов относительно высокой концентрации стерилизующий эффект отмечался независимо от температуры выращивания микробных клеток чумного микроба. Однако микробные клетки, выращенные при 37 °С, проявили более высокую чувствительность, погибая даже при 0,03125 % конечной концентрации детергента, в то же время стерилизующий эффект для клеток, выращенных при 28 °С, отмечался при $\geq 0,25$ % концентрации детергента.

Комплексное воздействие детергента и мочевины с прогреванием сократило время и снизило трудоемкость выделения ДНК по сравнению со стандартными методами.

В зависимости от существования *Y. pestis*, в организме блохи или теплокровного животного, на микроб действуют внешние сигналы, во многом определяющие состав генов, экспрессирующихся в данный момент и, соответственно, антигенный состав, характерный для векторной и/или гостальной фазы его существования [40]. В первую очередь, это температура среды обитания.

В процессе размножения *Y. pestis*, в макрофагах, в организме теплокровного хозяина, при температуре 37 °С и выше, начинает функционировать вирулон Υ_{op} , в следствие чего, наряду с другими антигенами, синтезируется F1 антиген. Формирование F1 капсулы чумного микроба находится под строгим температурным контролем, так, при температуре ниже 35 °С, в организме переносчика – блохи или *in vitro*, обнаруживается небольшая капсула, или она не обнаруживается вообще [40].

Для получения F1 чумного микроба бактериальную массу *Y. pestis* EV выращивали при 37 °С, на 3 % кровяном агаре. Для выделения субклеточных фракций – КО, использовали культуру *Y. pestis* EV, выращенную как при 28 °С, так и при 37 °С. Для выделения тотальной ДНК чумного микроба использовали культуру *Y. pestis* EV, выращенную при 37 °С. Затем культуру обеззараживали растворами мочевины (9 М раствор мочевины без добавок, с 1 % саркозилом, 1 % уксусной кислоты) и цетавлона. Клетки чумного микроба, выращенные при 37 °С,

обрабатывали 0,0625 % раствором цетавлона, а клетки, выращенные при 28 °С, обрабатывали 4 % раствором цетавлона.

Для освобождения от не разрушенных клеток обеззараженную бактериальную суспензию центрифугировали на холоду при 6000 об/мин (центрифуга ОС-6М, Россия) в течение 20 мин.

Клеточные оболочки выделяли центрифугированием супернатанта в течение 30 мин при 4 °С и 16000 об/мин (центрифуга К 25 D, Janetzki, Германия). Осадок дважды отмывали в дистиллированной воде и лиофильно высушивали. Для снижения токсичности суспензию клеточных оболочек (в концентрации 2 мг/мл) обрабатывали 0,1 % раствором дезоксихолата натрия в течение 10 мин при комнатной температуре

Капсульный антиген чумного микроба получали из супернатанта, после выделения клеточных стенок. Из цетавлоновых экстрактов клеток чумного микроба, выращенных при 37 °С, выделяли фракцию I путем изоэлектрического осаждения (рН 4,6-4,7) в комбинации с высаливанием сульфатом аммония, а из мочевиновых экстрактов – с изоэлектрическим осаждением (рН 4,3) в комбинации с высаливанием сульфатом аммония. Затем F1 антиген перерастворяли и лиофильно высушивали [4, 43, 58, 59].

Препарат суммарной ДНКт получали из клеток *Y. pestis* EV, выращенных на агаре Хоттингера (рН 7,2), в течение 18 часов при 37 °С. Культуру смывали забуференным физиологическим раствором, суспензию бактериальных клеток лизировали раствором, содержащим 1 % цетавлона, 0,1 М ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), 2 М NaCl и 5 М мочевины, рН 8, инкубировали в течение 10 мин. при 50 °С. После контроля специфической стерильности лизата выделяли ДНКт по В. И. Нактинису с соавт. [10].

На способ получения препарата нами был оформлен патент (Патент № 2248217 RU, МПК⁷ А 61 К 39/02. Способ получения иммуногенного препарата из *Yersinia pestis* EV)

Таким образом был получен ряд специфически стерильных лизатов:

1. Мочевинный экстракт клеток чумного микроба, выращенных при 28 °С.
2. Мочевинный экстракт клеток чумного микроба (с 1 % саркозилом), выращенных при 28 °С.
3. Мочевинный экстракт клеток чумного микроба (с 1 % уксусной кислоты), выращенных при 28 °С.
4. Цетавлоновый экстракт клеток чумного микроба, выращенных при 28°С.
5. Мочевинный экстракт клеток чумного микроба, выращенных при 37 °С.
6. Мочевинный экстракт клеток чумного микроба (с 1 % саркозилом), выращенных при 37 °С.
7. Мочевинный экстракт клеток чумного микроба (с 1 % уксусной кислоты), выращенных при 37 °С.
8. Цетавлоновый экстракт клеток чумного микроба, выращенных при 37 °С.

Полученные специфически стерильные лизаты использованы для выделения препаратов клеточных оболочек (КО), фракции 1 (F1) чумного микроба, а также для получения препарата суммарной ДНК *Y. pestis*.

Всего из лизатов чумного микроба выделено восемь препаратов КО, четыре препарата F1 и препарат ДНК (Таблица 3).

На основе препаратов клеточных оболочек чумного микроба и фракции поверхностных антигенов, извлекаемых с помощью мочевины и цетавлона, получены искусственные антигенные комплексы за счет механического смешивания, химического конъюгирования с использованием глутарового альдегида и сорбции на частицах коллоидного золота.

Искусственные антигенные комплексы получали за счет механического смешивания клеточных оболочек и F1 *Y. pestis* EV в соотношении 1:1 по сухому весу.

Комплексы на основе антигенов чумного микроба получали, смешивая 5,60 мг клеточных стенок с 6,25 мг капсульного антигена в 2,5 мл физиологического

раствора и обрабатывая ультразвуком на дезинтеграторе «MSE-150 Watt» (Англия) при 20 кГц 3-4 циклами по 5-7 секунд в ледяной бане.

Таблица 3 – Сравнительная характеристика специфически стерильных лизатов. Токсичность препаратов

Препараты	Серия препарата	Температура выращивания бактериальной массы, С°	Способ обработки бактериальной массы лизирующими растворами (1:1)	LD ₅₀
КО	1	28	9 М раствор мочевины	88 мкг Препараты не токсичны в дозе 125 мкг
	2	28	9 М раствор мочевины, содержащий 1 % саркозил	
	3	28	9 М раствор мочевины, содержащий 1 % уксусной кислоты	
	4	28	4 % раствор цетавлона (v/w)	
	5	37	9 М раствор мочевины	
	6	37	9 М раствор мочевины, содержащий 1 % саркозил	
	7	37	9 М раствор мочевины, содержащий 1 % уксусной кислоты	
	8	37	0,0625 % раствор цетавлона (v/w), обработан ДОХ	
F1	1	37	9 М раствор мочевины	Препараты не токсичны в дозе 1000 мкг
	2	37	9 М раствор мочевины, содержащий 1 % саркозил	
	3	37	9 М раствор мочевины, содержащий 1 % уксусной кислоты	
	4	37	0,0625 % раствор цетавлона (v/w), обработан ДОХ	
ДНК	1	37	1 % цетавлон, 0,1 М ЭДТА, 2 М NaCl и 5 М мочевины	Препарат не токсичен в дозах 15–250 мкг

В полученную суспензию осторожно, по каплям, при легком встряхивании добавляли 2,5 мл 5 % раствора глутарового альдегида. Смесь перемешивали в течение 3 ч при 37 °С и далее интенсивно диализовали против стерильного физиологического раствора (2 сут, 4 °С) с многократной сменой буфера.

Приготовление коллоидного золота и его комплексов с антигенами чумного микроба осуществляли следующим образом. 100 мл 0,01 %-ного раствора золото-

хлористоводородной кислоты до кипения, добавляли 300 мкл 10 %-ного раствора цитрата натрия. Смесь кипятили в течение 10 мин до появления интенсивного вино-красного цвета. После охлаждения рН золя золота доводили 0,2 М раствором K_2CO_3 до 7,6. К 1,5 мл золя золота добавляли 1 мл антигенного препарата, полученного суспендированием 6,25 мг клеточных стенок в дистиллированной воде с 6,25 мг капсульного антигена, обработанного ультразвуком на дезинтеграторе «MSE-150 Watt» (Англия) при 20 кГц 3-4 циклами по 5-7 секунд в ледяной бане. Полученную суспензию встряхивали 20 мин при комнатной температуре и хранили при 4 °С до использования

Некоторые полученные препараты оказались токсичным для мышей (Таблица 3). Наиболее токсичным оказался препарат клеточных оболочек, полученный из бактериальной массы, выращенной при 28 °С и обеззараженной 9 М мочевиной ($LD_{50} = 88$ мкг), этот препарат не был включен в дальнейшую работу.

Токсичностью обладает и препарат клеточных оболочек, полученный из бактериальной массы, выращенной при 37 °С и обработанной 0,0625 % раствором цетавлона ($LD_{50} = 203$ мкг). Однако токсичность этого препарата удалось существенно снизить обработкой их 1 % раствором ДОХ: в дозе 125 мкг (по сухому весу) животные не гибли, видимые изменения в месте прививки отсутствовали.

Не токсичными оказались препараты клеточных оболочек, получаемых из бактериальной массы, выращенной при 28 °С и обработанных смесью растворов мочевины и саркозила, смесью растворов мочевины и уксусной кислоты.

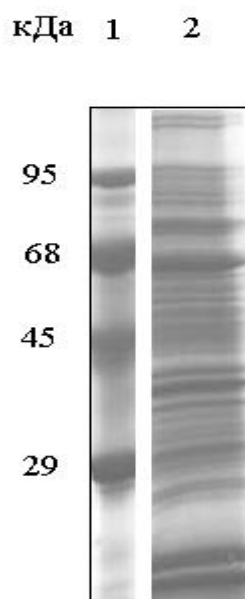
Препараты полученные из бактериальной массы, выращенной при 37 °С, извлекаемые из цетавлоновых и мочевиновых экстрактов также не были токсичными.

Препараты капсульного антигена в дозе до 1000 мкг и препарат ДНК чумного микроба в дозах 15,625 – 250 мкг токсичного действия не оказывают.

3.2 Физико-химические свойства субклеточных фракций, антигенов и искусственного антигенного комплекса *Y. pestis* EV

Анализ химического состава мембранного препарата КО показал, что содержание белка в нем составляет 55,5 %, нуклеиновых кислот – 0,4%, эквивалентов глюкозы – 2 %, 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты – 0,6 %, мурамовой кислоты – 0,9 %.

Электрофоретический анализ в 10 % ПААГ (Рисунок 1) выявил наличие в препарате КО вакцинного штамма чумного микроба большое количество полипептидов с мол. массами от 13 кДа до 100 (и несколько выше) кДа, а так же ЛПС (R-форма).



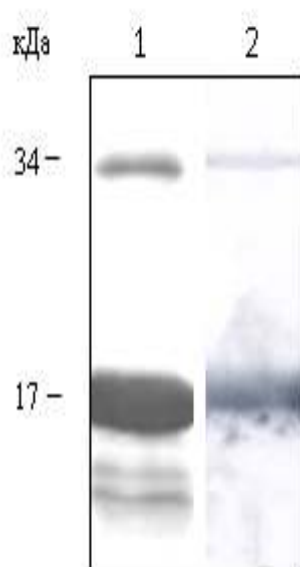
1 – маркерные белки: 95, 68, 45, 29 кДа; 2 – препарат КО

Рисунок 1 – Электрофорез препарата клеточных стенок (КС) чумного микроба в 10 % полиакриламидном геле окраской ионами серебра

При исследовании химического состава препаратов F1 выявлено содержание в них белка свыше 90 %, углеводов 3 % и нуклеиновых кислот менее 1 %.

Электрофоретический анализ в 15 % – ПААГ показал наличие в препарате F1 мажорного полипептида с мол. массой 17 кДа (Рисунок 2). Препарат, выделен-

ный из цетавлонового экстракта, отличался от антигенов мочевиновых экстрактов большей гетерогенностью и содержал несколько полипептидов с мол. массами от 29 до 92 кДа. Наличие F1 в этой фракции подтвердилось иммуноблотингом. Иммунодоминантным компонентом препарата является мажорный полипептид с мол. массой 17 кДа. Дополнительная проявляющаяся полоса на реплике, возможно соответствует димеру капсульного антигена с мол. массой 34 кДа



1 – электрофорез препарата F1 чумного микроба в градиентном ПААГ (7,5-15 %) с додецилсульфатом натрия. 2 – иммуноблотинг F1 с иммуноглобулинами из гипериммунной кроличьей сыворотки, меченных коллоидным серебром. F1 – полипептид с мол. массой 17 кДа, 34 кДа – димер антигена

Рисунок 2 – Электрофореграмма и иммуноблотинг препарата F1 чумного микроба

Лиофильно высушенный препарат ДНК растворялся в воде и водных растворах, образуя опалесцирующую взвесь.

УФ-спектроскопия препарата ДНК чумного микроба. Отношение поглощения при длинах волн 260нм/280нм равно 1,81, что говорит о чистоте препарата

ДНК, отсутствии примесей фенола или иных контаминирующих агентов. Содержание белка в препарате ДНК не превышает 0,6 %.

Гель-электрофорез препарата ДНК в 0,6 %-ном агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием выявил одну высокомолекулярную полосу, мигрирующую значительно медленнее самого большого из маркерных белков (6000bp).

Таким образом, спектрофотометрия и электрофорез в агарозном геле свидетельствуют о гомогенности препарата ДНК и отсутствии в нем посторонних примесей.

3.3 Иммунохимические свойства субклеточных фракций, антигенов и искусственного антигенного комплекса чумного микроба

Иммунохимическую активность и специфичность полученных препаратов исследовали с помощью экспериментальных диагностических препаратов: гипериммунных кроличьих сывороток, (иммунизация животных F1-антигеном), а также поливалентных сывороток, (иммунизация кроликов вакцинным штаммом *Y. pestis* EV). Титр антител экспериментальных сывороток устанавливался в РПГА с антигенным эритроцитарным чумным диагностикумом (Рисунок 3.), который составляет от 1:20 тыс до 1:640 тыс.

Титр антител полученных сывороток в ИФА составляет 10^{-6} – $3 \cdot 10^{-6}$, в РИД – 1:32–1:128.

Были приготовлены антисыворотки против иммуноглобулинов G, M, а также IgG. Для исследования иммунохимической активности и специфичности препаратов использовались коммерческие диагностикумы: анти-F1 моноклональный диагностикум (НИИ микробиологии, г. Киров) и «ИХ тест *Y. pestis*» (ФГУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск). Антигены выявляли так же с использованием мышинных моноклональных антител против капсульного антигена чумного микроба ФГУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск) и коммерческим конъюгатом антивидовым иммунопероксидазным (против IgG мыши) МТО «Инициатива» (г. Щелково)

Исследование иммунохимических свойств субклеточных фракций и антигенов, а также созданных на их основе искусственных антигенных комплексов чумного микроба проводилось с использованием ряда иммунохимических методов: ИФА (иммуноблотинг и дот-иммуноанализ) и РИД.

С помощью иммуноблотинга установлено наличие капсульного антигена в полученных препаратах F1. Иммунодоминантным компонентом препарата является мажорный полипептид с мол. массой 17 кДа. Дополнительная проявляющаяся полоса на реплике, возможно соответствует димеру капсульного антигена с мол. массой 34 кДа (Рисунок 2).

Реакция иммунодиффузии с кроличьей чумной антифракционной сывороткой показала, что полученный препарат содержит в своем составе капсульный антиген F1. Препараты F1 дают по одной линии преципитации с кроличьей поливалентной чумной антисывороткой, что также указывает на присутствие в них антигена F1 (Рисунок 3).

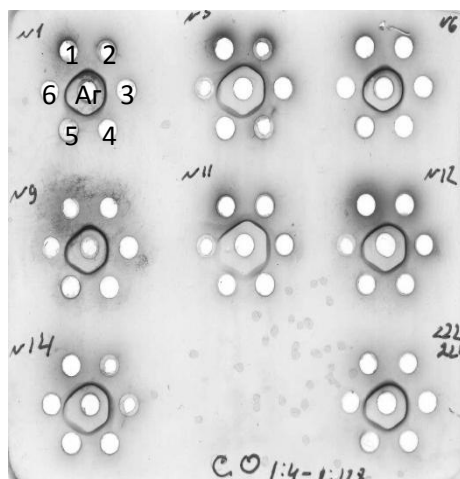


Рисунок 3 – РИД антигенного препарата F1, содержащего капсульный антиген чумного микроба с кроличьими чумными поливалентными и антифракционными сыворотками

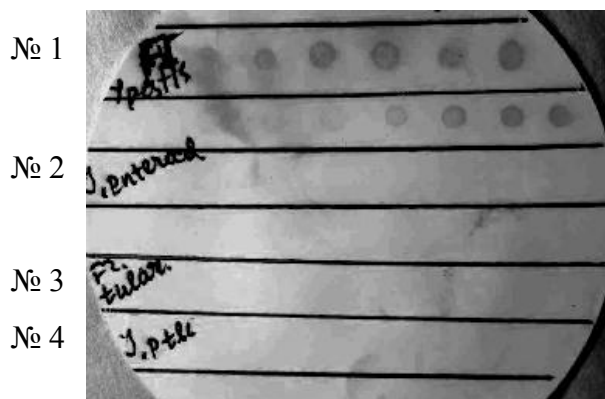
Объем наносимого материала равен 20 мкл, концентрация антигенного материала (Аг) 1мг/мл, 1 – 6 разведения сыворотки, начальное разведение 1 = 1:4. Время инкубации 24 часа. № 1, 5, 6, 14 – антигенный препарат F1 с поливалентными чумными сыворотками, № 9, 11, 12, 222–224 – антигенные препараты F1 с антифракционными сыворотками.

Для обнаружения антигенов *Y. pestis* и антител к ним, с помощью Дот-иммуноанализ установлено, что препараты капсульного антигена, давали положительную реакцию с анти-F1 моноклональным диагностикумом (НИИ микробиологии, г. Киров). Подобным образом наличие капсульного антигена было показано в искусственных антигенных комплексах чумного микроба.

Также был проведен Дот-иммуноанализ с использованием специфических антител, меченых дисперсным красителем «Dianix luminous red B» (DyStar, Германия) (Рисунок 4). Текстильный дисперсный краситель «Dianix luminous red B» использован в качестве альтернативы коллоидному серебру, ранее никем с этой целью не использованный, на сколько нам известно.

Как оказалось, наибольшей антигенной активностью обладают препараты, выделенные из клеток *Y. pestis* EV, убитых мочевиной (9 М раствор мочевины) или цетавлоном (0,0625 % раствор цетавлона) (препараты КО серий 5 и 8, препараты F1 серий 1 и 4).

В искусственно приготовленном антигенном комплексе (КО и F1) с помощью дот – иммуноанализа с использованием специфических антител, меченных частицами коллоидного серебра, установлено наличие капсульного антигена чумного микроба.



№ 1 – капсульный антиген *Y. pestis* EV (исходное разведение 1 мг/мл, второе – 10 мкг/мл, последующие разведения в 2 раза), № 2 - микробная взвесь *Y. enterocolitica* И-76 (исходная концентрация 10^7 м.к./мл, последующие разведения в 2 раза), 3 – микробная взвесь *F. tularensis* № 15 НИИЭГ (исходная концентрация 10^7 м.к./мл), № 4 – микробная взвесь *Y. pseudotuberculosis* 719 (исходная концентрация 10^7 м.к./мл). Чувствительность дот-иммуноанализа с коллоидным маркером для чистой культуры составляла $\geq 5 \times 10^4$ м.к./мл. Чувствительность определения капсульного антигена чумного микроба составляла $\geq 4,8$ нг/мл. Перекрестное реагирование с близкородственными в антигенном отношении микроорганизмами (*Y. enterocolitica* O:3 (2 штамма), O:9 (2 штамма), *Y. pseudotuberculosis* (6 штаммов), *F. tularensis*) в концентрациях $\leq 10^7$ м.к./мл. отсутствовало

Рисунок 4 – Дот-иммуноанализ с использованием антифракционных иммуноглобулинов, меченых частицами коллоидного красителя

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.

3.4 Установлене саногенетических механизмов протективной активности искусственного антигенного комплекса *Y. pestis* EV и в сочетании с адъювантами

3.4.1 Протективная активность субклеточных фракций, адъювантов и искусственного антигенного комплекса чумного микроба

Протективное действие препаратов изолированных субклеточных фракций чумного микроба определялось на белых беспородных мышах обоих полов весом 18–20 г, (по 5 особей на одну дозу препарата) отношении их подкожного заражения через 21 сутки вирулентным штаммом *Y. pestis* И-2683 в дозе 200 LD₅₀. Препараты клеточных оболочек вводились подкожно, однократно в дозах 3,90-125 мкг, капсульного антигена – 7,8-1000 мкг, комплексный препарат, состоящий из смеси равных количеств капсульного антигена и клеточных оболочек, в дозах от 3,9 до 62,5 мкг (количество вводимого животным материала рассчитывалось по сухому весу). Контрольными группами служили не иммунизированные (интактные) и иммунизированные подкожно в дозах 10⁴–10⁷ КОЕ вакцинным штаммом *Y. pestis* EV животные. Падеж животных учитывался в течение 23 суток после их заражения. Подсчет величины иммунизирующей дозы, вызывающей защиту 50 % взятых в опыт животных (ImD₅₀), осуществлялся по формуле Кербера, а также по методу Рида и Менча с оценкой доверительных интервалов по формуле Пицци [3]. В ряде случаев протективная активность препаратов оценивалась по критерию χ^2 [3]. Результаты считали достоверными, если вероятность ошибки не превышала 0,05 (P < 0,05) по отношению к отрицательному контролю [3].

Острая токсичность полученных препаратов определялась на белых беспородных мышах весом 18–20 г. при однократном подкожном введении в дозах от 0,125 до 1 мг (по сухому весу, по 5 особей на одну дозу), с определением LD₅₀. Учет результатов проводился в течение 7 суток после инъекции. Установлено, что препараты в данных дозировках являются не токсичными для белых мышей. LD₅₀

(88 мкг) удалось установить для препарата КО, полученного при обработке микробной массы 9М раствором мочевины (Таблица 4).

Пять из восьми полученных препаратов клеточных оболочек, и два из четырех препаратов F1, изолированных из клеток *Y. pestis* EV, выращенных при 28 °С и обработанных 9 М раствором мочевины с 1 % саркозилом, 1 % уксусной кислотой и 4 % раствором цетавлона, а также выращенных при 37 °С и обработанных 9 М раствором мочевины, содержащим 1 % саркозила и 1 % уксусной кислоты (препараты КО 1, 4, 5, 6, 7; препараты F1 2, 3), однократно введенных беспородным белым мышам, не защищали животных от последующего заражения культурой вирулентного штамма *Y. pestis* И-2683 (в дозе – 200 LD₅₀) и существенно не изменяли при этом сроков их жизни. КО 2 получаемый обработкой 9 М раствором мочевины, содержащий 1 % саркозил (выращенной при 28°С) ImD₅₀ – 583,1мкг. КО 3 получаемый обработкой 9 М раствором мочевины, содержащий 1 % уксусной кислоты (выращенной при 28°С) ImD₅₀ – 280мкг. F1 (препарат 1) получаемый обработкой 9 М раствором мочевины ImD₅₀ = 615,6 мкг.

Препарат ДНК чумного микроба, сам по себе, однократно введенный беспородным белым мышам, также не защищал животных от последующего заражения культурой вирулентного штамма *Y. pestis* И-2683 (в дозе – 200 LD₅₀) и существенно не изменяли при этом сроков их жизни.

Изучение протективной активности препаратов КО, полученных разными методами обработки микробной массы чумного микроба показало, что препарат КО (КО8), извлекаемый цетавлоном из культивируемых при 37°С клеток выращенного штамма EV (с последующим изоэлектрическим осаждением), обладает наиболее выраженным защитным действием в тесте активной защиты белых мышей (ImD₅₀ – 11мкг), отличие от препаратов фракций полученных при обработке микробной массы растворами мочевины с саркозилом или мочевины с уксусной кислотой, несмотря на то, что удельное содержание F1 в последних было выше. На способ получения иммуногенного препарата из *Y. pestis* EV, путем обработки цетавлоном выдан патент на изобретение (Патент РФ № 2248217).

Таким образом, из всех субклеточных фракций *Y. pestis* EV выраженной протективной активностью обладают препараты, получаемые обработкой 0,0625 % раствором цетавлона (с последующей обработкой ДОХ) выращенной при 37 °С микробной массы – КО (препарат 8) и F1 (препарат 4) (ImD_{50} = 11 и 21 мкг, соответственно) (Таблица 4). Введение достаточно высоких доз указанных препаратов (31,25 – 1000 мкг) защищает 100 % взятых в опыт белых мышей от последующего заражения вирулентным штаммом *Y. pestis*. Эти препараты были использованы в дальнейших исследованиях.

Таблица 4 – Протективная активность препаратов КО и F1

Препараты	Серия препарата	Т выращивания бактериальной массы, С°	Способ обработки бактериальной массы лизирующими растворами (1:1), Т °С	Доза мкг	Заражено животных	Выжило	ImD_{50} мкг
КО	8	37	0,0625 % раствор цетавлона (v/w), обработан ДОХ	1000	5	5	11 мкг
				500	5	5	
				250	5	5	
				125	4	4	
				62,5	5	5	
				31,3	5	5	
				15,6	5	3	
				7,8	5	2	
F1	4	37	0,0625 % раствор цетавлона (v/w), обработан ДОХ	1000	5	5	21 мкг
				500	5	5	
				250	5	5	
				125	5	4	
				62,5	4	3	
				31,3	5	4	
				15,6	5	2	
				7,8	3	1	
<i>Y. pestis</i> EV				10^7	5	4	$2 \cdot 10^5$ м. т.
				10^6	5	4	
				10^5	5	3	
				10^4	5	0	
контроль			интактные		10	0	

Полученные из указанных препаратов КО и F1 искусственные антигенные комплексы чумного микроба также проявляют выраженное протективное действие в тесте защиты белых мышей (ImD_{50} = 11 мкг). Конъюгированный, глутаровым альдегидом препарат F1 и необработанных ДОХ КО (в дозе по 250 мкг каж-

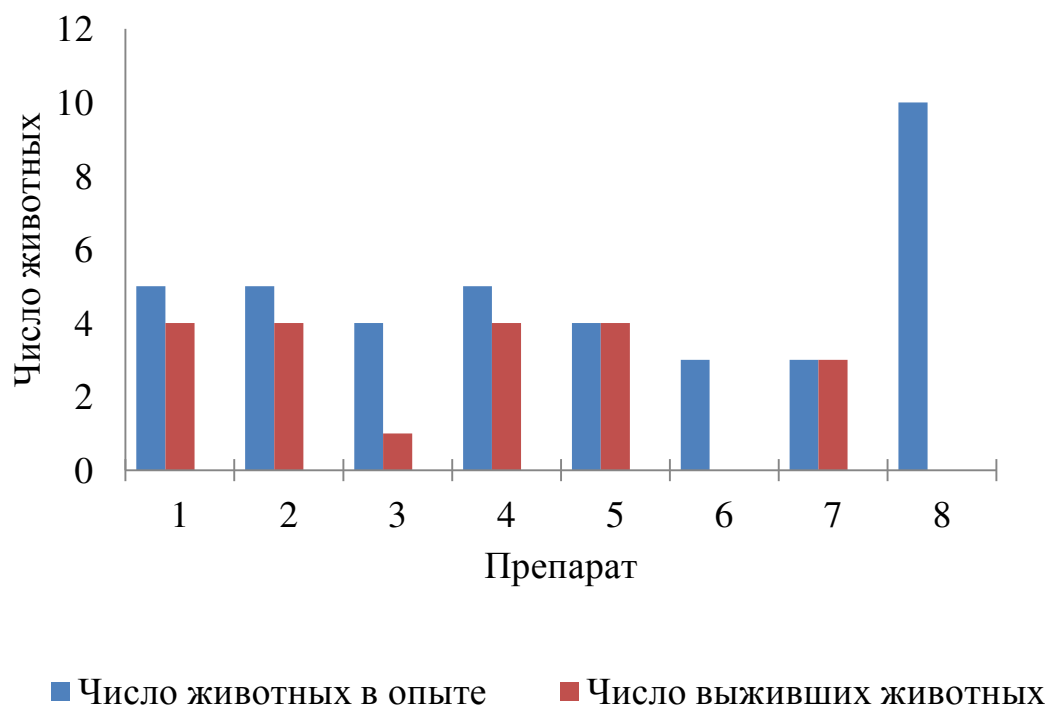
дого компонента) также защищает всех взятых в опыт лабораторных животных от последующего заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* И-2683 (в дозе 200 LD₅₀). Сорбция КО и F1 на частицах коллоидного золота не оказывала статистически значимого влияния на протективную активность субклеточных фракций чумного микроба.

Протективная активность комплекса КО и F1 антигена *Y. pestis* EV при однократном парентеральном введении в тесте защиты белых мышей при заражении их через 21 сутки после иммунизации культурой *Y. pestis* И-2683 в дозе 200 LD₅₀ представлена в таблице 5 и рисунке 5.

Таблица 5 – Протективная активность комплексов клеточных стенок и капсульного антигена *Y. pestis* EV

Препарат	Число животных		χ^2	p*
	в опыте	Выжило		
КО + F1	5	4	12,81*	< 0,05
КО + F1, адсорбированные на частицах коллоидного золота	5	4	12,81*	< 0,05
КО + F1 + поливинилимидазолом (0,02 %)	4	1	1,18	>0,05
КО + F1 + поливинилимидазолом (0,01 %)	5	4	12,81*	< 0,05
конъюгат КО + F1 глутаровым альдегидом	4	4	14,6	< 0,05
Контроли заражения:				
<i>Y. pestis</i> EV в дозе 10 ⁵ м. к.	3	0	–	–
<i>Y. pestis</i> EV в дозе 10 ⁶ м. к.	3	3	–	–
Интактные животные	10	0	–	–

Примечание * – достоверность данных по отношению к контролю



Препараты: 1 – КО + F1 КО + F1; 2 – КО + F1 КО + F1, адсорбированный на частицах коллоидного золота; 3 – КО + F1 + ПВИ (0,02 %); 4 – КО + F1 + ПВИ (0,01 %); 5 – конъюгат КО + F1 с ГА; 6 – *Y. pestis* EV в дозе 10^5 м. к.; 7 – *Y. pestis* EV в дозе 10^6 м. к.; 8 – интактные животные

Рисунок 5 – Протективная активность комплексов клеточных оболочек и капсульного антигена *Y. pestis* EV

Показано, что введение КО, конъюгированных с F1 антигеном защищает 100 % взятых в опыт белых мышей от последующего заражения вирулентным штаммом чумного микроба (Таблица 5). Препарат, полученный простым механическим смешиванием КО с F1, защищал только 80 % взятых в эксперимент лабораторных животных. Сорбция КО и F1 на частицах коллоидного золота и добавление поливинилимидазола не оказывают статистически значимого влияния на протективную активность субклеточных фракций чумного микроба.

В дальнейших исследованиях использовались препараты получаемые обработкой 0,0625 % раствором цетавлона (с последующей обработкой ДОХ) выращенной при 37 °С бактериальной массы – КО (препарат 8) и F1 (препарат 4) и искусственные антигенные комплексы на их основе, так как из всех полученных субклеточных фракций клеток *Y. pestis* они обладают выраженной протективной активностью, наибольшей антигенной активностью, и не были токсичными.

3.4.2 Протективная активность искусственного антигенного комплекса чумного микроба в сочетании с иммуномодуляторами различного происхождения

Искусственный антигенный комплекс приготовлен путем механического смешивания препаратов клеточных оболочек и капсульного антигена вакцинного штамма чумного микроба в соотношении 1:1 (по сухому весу). В качестве иммуномодуляторов использованы мурамилдипептид (МДП) – N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine («Calbiochem»), арабиногалактан (АГ) из лиственницы сибирской (Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского) и суммарная ДНК вакцинного штамма чумного микроба.

Испытание протективной активности антигенного комплекса чумного микроба с добавлением иммуномодуляторов и без них проводилось на беспородных белых мышах. Животных (по 5 особей на 1 дозу) иммунизировали однократно полученным препаратом в дозах от 7,8 до 62,5 мкг (по сухому весу препарата) самостоятельно и вместе с МДП, АГ и ДНК. Через 21 сут животных заражали вирулентным штаммом *Y. pestis* И-2683 в дозе 200 LD₅₀. Одну контрольную группу животных иммунизировали коммерческой вакциной EV в дозах от 1·10⁴ до 1·10⁷ м. к. Другим контрольным группам вводился физ. раствор и раствор ДНК (по 10 мкг. Установлено, что, несмотря на наличие высокой протективной активности комплексного препарата, все взятые в опыт иммуномодуляторы повышали протективную активность комплексного препарата, полученного на основе субклеточных фракций чумного микроба. Протективная активность комплекса клеточных оболочек и фракции I *Y. pestis* EV в смеси с иммуномодуляторами при одно-

кратном парентеральном введении в тесте защиты белых мышей при заражении их через 21 сутки после иммунизации культурой *Y. pestis* И-2683 в дозе 200 LD₅₀ представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Протективная активность комплекса клеточных оболочек и F1 *Y. pestis* EV в сочетании с иммуномодуляторами

Препарат	Доза, мкг	Им- муно- моду- лятор	Доза, мг	Кол-во 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	
КО + F1	62,5	ДНК*	0,01	4	4	0	14,6
	31,25			3	3	0	
	15,6			5	2	3	
	7,8			5	1	4	
<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	

Примечание: * (введение за 3 суток до заражения)

Наибольшей протективной активностью обладает смесь антигенов чумного микроба с МДП: после заражения вирулентным штаммом выжили все взятые в опыт животные, независимо от иммунизирующей дозы (ImD_{50} , 5,6 мкг). Несколько меньшей протективной активностью обладал комплексный препарат в смеси с суммарной ДНК *Y. pestis* EV: ImD_{50} 6,4 и 14,62 мкг. При этом отмечено выживание 18 из 19 взятых в опыт животных. Сама по себе ДНК не проявила защитного действия в отношении вирулентного штамма чумного микроба (Таблица 6). При введении же ДНК отдельно от комплексного препарата за 3 сут до заражения мышей, получивших иммунизирующую дозу препарата 7,8 мкг выжило 1 животное (из 5 взятых в опыт), дозу 15,6 мкг – 2 из 5 взятых в опыт животных, дозы 62,5 и 31,25 мкг все животные выжили. Судя по значению ImD_{50} (Таблица 7), животные этой группы, получавшие комплекс КО + F1 и ДНК за 3 сут до заражения (ImD_{50} 14,62 мкг) по выживаемости почти не отличались животных, получивших комплекс КО + F1 (ImD_{50} 14,35 мкг) Наименьшей протективной активностью обладал комплекс КО + F1 с АГ (ImD_{50} 8,85 мкг). В контроле после заражения вирулентным штаммом чумного микроба все животные пали (Таблица 6). Живая вакцина EV при иммунизирующих дозах 10^5 , 10^6 и 10^7 м. к. защищала всех взятых в опыт животных. При иммунизирующей дозе 10^4 м. к. – выжило 3 из 5 взятых в опыт животных.

Таким образом, создаваемый комплексным вакцинирующим препаратом в сочетании с синтетическим МДП или с суммарной ДНК *Y. pestis* EV активный иммунитет обеспечивает резистентность к чуме, о чем свидетельствует выживаемость (при оптимальных иммунизирующих дозах) всех зараженных животных. МДП и препарат суммарной ДНК возбудителя чумы увеличивают иммунологическую эффективность субклеточных фракций чумного микроба. Это свидетельствует о перспективности использования этих иммуномодуляторов и, возможно, их аналогов и производных, таких как N-ацетилглюкоаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин (ГМДП, лекарственное название – ликолипид [14, 20, 22, 39, 54] и синтетических олигодинуклеотидов [21, 25, 215, 258] в качестве адъювантов при конструировании химических вакцин против чумы. Данные об иммуностиму-

лирующей активности ДНК чумного микроба согласуются с работами E. D. Williamson с соавт. [259] об усилении плазмидной ДНК иммунного ответа мышей на введение V-антигена *Y. pestis*.

Кроме того, в ходе получения и исследования препаратов с помощью различных иммунохимических и бактериологических методов показало, что прижизненная обработка клеток чумного микроба растворами мочевины и цетилтриметиламмоний бромида в подобранных условиях позволяет получать иммуногенные субклеточные фракции чумного микроба и при этом обладает мощным бактерицидным действием. Это подтверждает перспективность идеи выделения антигенов непосредственно из живых, а не из убитых традиционными методами микробных клеток.

Протективная активность полученного антигенного комплекса (в дозе 31.2 мкг) без добавок и в смеси с МДП (в дозе 10 мкг), АГ (в дозе 40 мкг) и суммарной ДНК (в дозе 10 мкг) была исследована также при одновременном проведении неспецифической профилактики чумы антибиотиком доксициклином. Схема № 1 вакцинации белых мышей антигенным комплексом с иммуностимуляторами при сочетанном введении доксициклина включала 6 групп животных (по 10 особей в группе), иммунизированных: антигенным комплексом (1 группа); антигенным комплексом + МДП (2 группа); антигенным комплексом + АГ (3 группа); антигенным комплексом + ДНК (4 группа); антигенным комплексом + АГ за сутки до заражения (5 группа); АГ (6 группа). Антигенный комплекс был введен за 14; 7; 5; 3 и 1 сутки до заражения. За сутки, двое и трое до заражения вирулентным штамом *Y. pestis* И-2683 (в дозе 200 LD₅₀) животные получали внутримышечно (трехкратно) доксициклин в суммарной дозе 0,6 мг. Одна контрольная группа – К2 включала животных, получивших за сутки, двое и трое до заражения только антибиотик; другая – К1 интактные мыши.

Установлено, что в 4 группе животных (КО + F1 с ДНК), получивших препараты за 14; 7; 5 суток (выжило 50 %), в 5 группе (КО + F1 с АГ) на 7, 14 сутки (выжило – 50 и 60 %). На 5-ые сутки в 1 группе (КО + F1) выжило 6 из 10 животных. При введении животным антигенного комплекса с МДП (2 группа) за 7 суток

до заражения выжила половина из взятых в опыт белых мышей. Во всех контрольных группах все животные пали в течение 4 суток.

Следующая схема вакцинации (№ 2) включала 3 группы животных (по 70 особей в группе), однократно иммунизированных: антигенным комплексом (I группа); антигенным комплексом с ДНК (II группа); антигенным комплексом с АГ (III группа) и контрольную группу животных. Антигенный комплекс вводили в дозе 31,2 мкг (по сухому весу), ДНК – в дозе 10 мкг, АГ – в дозе 40 мкг. Препараты вводили в один день с заражением белых мышей. Для заражения животных использовали вирулентный штамм *Y. pestis* И-2683 в дозе 200 LD₅₀. Доксициклин вводили животным, разбитым на подгруппы (по 10 особей), в течение 1 (первое введение за 1 час до заражения), 2, 3, 4, 5, 6 суток внутримышечно дважды в день (через 12 часов) в дозе 0,2 мг. В контрольную группу включили животные, не иммунизированные вакцинирующими комплексами, им был введен только доксициклин. В каждой группе животных имелись контрольные подгруппы без введения антибиотика.

В контрольных группах животных, не получивших доксициклин и получивших антибиотик в течение 1 и 2 суток, отмечен падеж всех взятых в опыт животных. Среди животных, получивших доксициклин в течение 3 суток, выжила 1 из 10 взятых в опыт особей. В подгруппах, получивших доксициклин в течение 4, 5 суток, выжило соответственно 55 % и 50 % животных. Все животные, подвергшиеся введению доксициклина в течение 6 суток, выжили.

В группе животных, иммунизированных антигенным комплексом без доксициклина, выжило 40 % животных. При добавлении в схему вакцинации экстренной неспецифической профилактики выживаемость животных в подгруппах на 1, 2, 3, 4, 5, 6-ые сутки достигла 50 %, 44,4 %, 70 %, 77,7 %, 90 %, 90 %, соответственно.

В группе животных, иммунизированных антигенным комплексом в смеси с ДНК без доксициклина, выжило 20 % животных. На фоне применения антибиотика выживаемость животных на 1, 2, 3, 4, 5, 6-ые сутки составила 30 %, 40 %, 100 %, 100 %, 100 %, 90 %, соответственно.

В группе животных, иммунизированных антигенным комплексом в смеси с АГ без антибиотика, выжило 44,5 % взятых в опыт белых мышей. При введении доксициклина в течение 1 суток показатель уровня выживаемости резко упал до 10 % с последующим его увеличением при введении антибиотика: в течение 2 суток – 60 %, 3 суток – 77,7 %, 4 суток – 100 %, 5 суток – 90 %, 6 суток – 100 %.

Таким образом, введение одного антигенного комплекса в день заражения защищает от гибели 40 % взятых экспериментальных животных, а на фоне проведения экстренной неспецифической профилактики (введение доксициклина 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 трех 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 доксициклина не снижает защитных свойств комплексного препарата, как самого по себе, так и в сочетании с модуляторами.

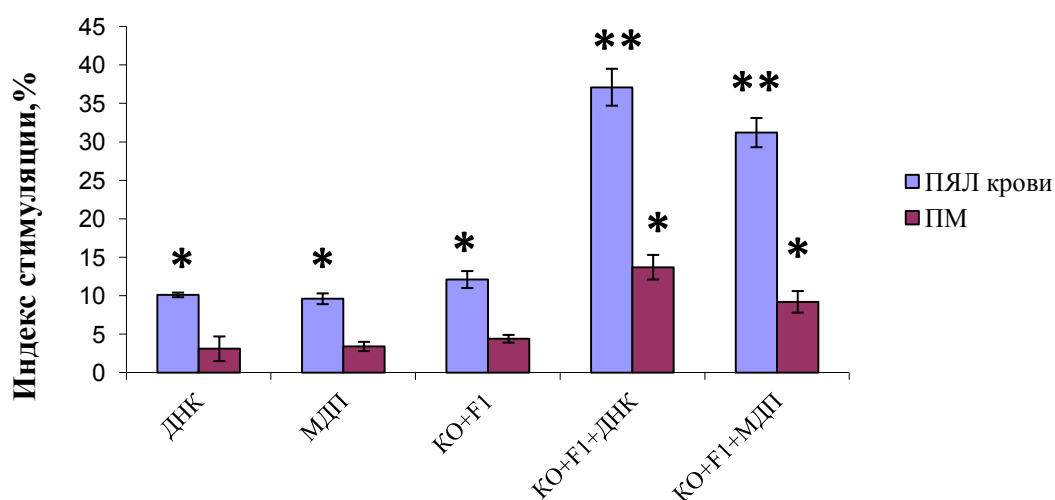
3.5 Функциональное состояние бактерицидных систем фагоцитов *in vitro* под действием искусственных антигенных комплексов чумного микроба в сочетании с адьювантами

Опыты по изучению функционального состояния фагоцитов проведены с использованием 64 сертифицированных (НПО «Вектор», г. Новосибирск) белых беспородных мышах массой 18–20 г.

Клетки фагоцитарного ряда представлены лейкоцитами крови и перитонеальными макрофагами, полученными по общепринятым методикам. Данный материал содержал 98–99 % интересующих нас клеток иммунофагоцитарной системы, что подтверждается подсчетом фагоцитов в камере Горяева и окраской по Романовскому-Гимза. Жизнеспособность клеток, оцененная в тесте с трипановым синим, составляла 96–98 %. Животных выводили из эксперимента воздушной эмболией сосудов сердца и декапитацией позвонков шейного отдела позвоночника в

соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (2003 г.). Исследуемый образец (10^6 фагоцитов/мл) примировали экспериментальным препаратом (F1+КО) в дозе 25 мкг и/или его сочетанием с тДНК (F1+КО+ДНК) и мурамилдипептидом (F1+ КО+МДП) в течение 120 мин при 37 °С с последующим определением активности NO-синтазы (продукция NO_2 в мкМ/мл фагоцитов), уровня содержания неферментных катионных белков и суммарной активности ферментов дыхательной цепи (НСТ-тест) [22]. Контролем служили интактные фагоциты [76, 77]. Статистический анализ данных проводили подсчетом средних величин (M) и стандартных отклонений (δ), выраженных в виде индекса стимуляции в процентах. Для сравнения средних величин выборок использовали двухвыборочный F-тест для дисперсии и U-критерий Манна-Уитни. Различия между средними из выборок считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$ [3, 76, 77].

В ходе исследования установлено, что экспериментальный препарат КО+F1 в сочетании с адьювантами (тДНК, МДП) оказывает стимулирующее влияние на активность NO-синтазы как лейкоцитов крови, так и клеток системы мононуклеарных фагоцитов белых мышей (Рисунок 6). Так, значения индекса стимуляции продукции NO_2 фагоцитами, обработанными комплексом антигенных детерминант в сочетании с адьювантами, имели положительные значения.

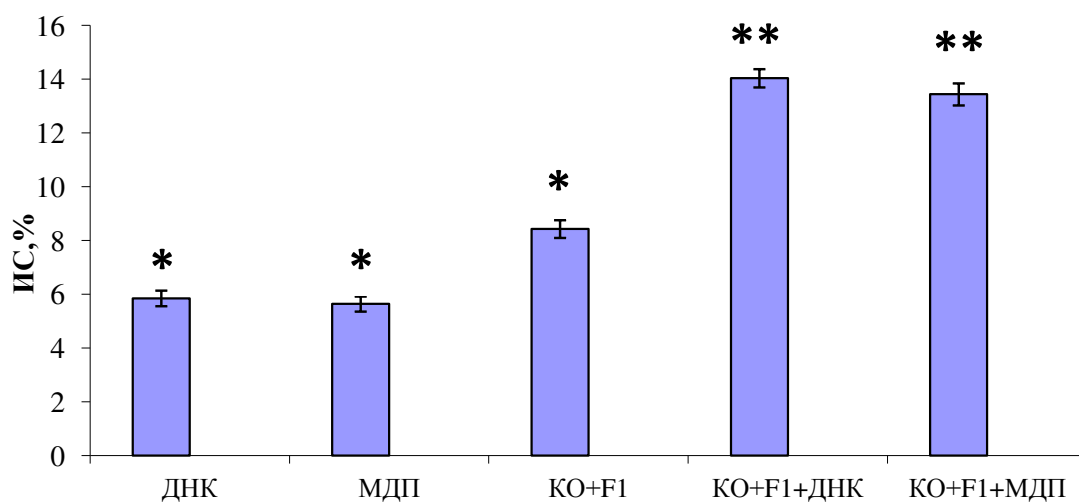


* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,001$

Рисунок 6 – Активность NOS фагоцитов

Нами выявлены различия между препаратами по степени стимулирующего воздействия на активность NO-синтазы. Показано, что максимальные уровни продукции NO зарегистрированы у клеток иммунофагоцитарной системы, обработанных КО+F1+ДНК ($37,1 \pm 2,4$) и КО+F1+МДП ($31,2 \pm 1,9$). Достоверных различий между фагоцитами обеих клеточных популяций, обработанных по отдельности КО+F1, тДНК, МДП не выявлено. Установлено, что в лейкоцитах, стимулированных экспериментальными препаратами образование NO происходит более интенсивно в среднем в 3,0 раза, чем в перитонеальных макрофагах ($P < 0,05$).

Результаты определения активности кислороднезависимого метаболизма гранулоцитов под воздействием субклеточных фракций чумного микроба свидетельствуют о стимулирующем влиянии экспериментальных препаратов на содержание неферментных катионных белков в фагоцитах (Рисунок 7).



* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,001$

Рисунок 7 – Индекс стимуляции содержания НКБ

Использованные в эксперименте адъюванты (тДНК, МДП) усиливают стимулирующий эффект комплексного препарата (КО+F1) на уровень содержания НКБ в лейкоцитах крови экспериментальных животных, что выражается в более высоких показателях ИС (индекс стимуляции), по сравнению с аналогичными клетками, обработанными различными стимуляторами по отдельности. Наиболь-

шим стимулирующим эффектом на повышение содержания НКБ обладает в наших экспериментах КО+F1 в сочетании с бактериальной ДНК ($14,1 \pm 0,3$).

Показано стимулирующее влияние как адъювантов (тДНК, МДП), так и самого комплекса антигенных детерминант чумного микроба (КО+F1) на активность кислородзависимого метаболизма лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов экспериментальных животных (Рисунок 8). Максимальные значения НСТ-теста зарегистрированы у фагоцитов, инкубированных с КО+F1+ДНК, которые достоверно ($P < 0,05$) превышают аналогичные показатели у фагоцитов, инкубированных по отдельности с КО+F1, МДП и тДНК в 2,7; 3,8 и 3,4 раза, соответственно.

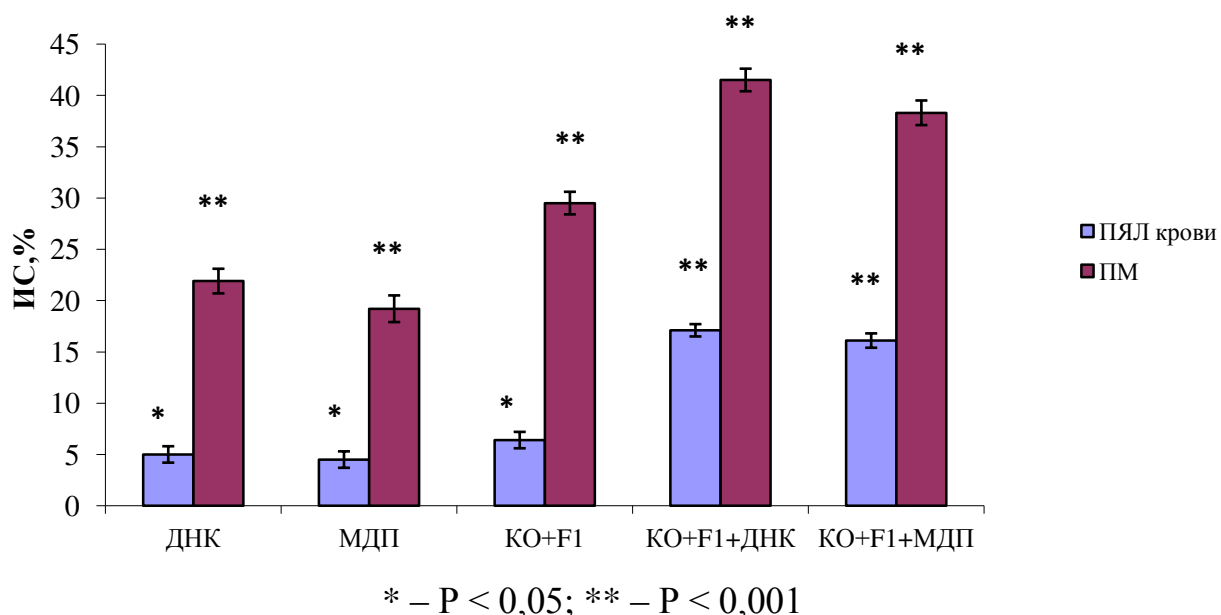


Рисунок 8 – Активность кислородзависимого метаболизма (НСТ-тест)

Уровень продукции активных кислородных радикалов перитонеальными макрофагами после воздействия субклеточными фракциями чумного микроба был в 2,4–4,6 раза выше чем лейкоцитами белых мышей ($P < 0,05$).

Полученные *in vitro* результаты, свидетельствуют о стимулирующем активностью бактерицидных систем фагоцитов эффекте, который оказывает комплексный препарат на основе антигена и клеточных оболочек в сочетании с тДНК чумного микроба и МДП. Экспериментальный препарат КО+F1 в сочетании с адъювантами (тДНК, МДП) стимулирует активность NO-синтазы лейкоцитов крови и

клеток системы мононуклеарных фагоцитов белых мышей [76, 77]. Результаты определения активности кислороднезависимого метаболизма гранулоцитов под воздействием субклеточных фракций чумного микроба также показывают о 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 проведенных исследований показана роль искусственных антигенных комплексов на основе клеточных мембран и F1 чумного микроба в сочетании с адьювантами в реализации бактерицидных механизмов фагоцитоза (кислород-, нитроксидзависимых и кислороднезависимых) клеток иммунофагоцитарной системы.

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

Подопытных животных распределили на восемь групп. Белым мышам шести опытных групп подкожно вводили следующие препараты: КО+F1 (2,5 мкг/0,2 мл забуференного физиологического раствора, ЗФР); тДНК (по 2,5 мкг/0,2 мл ЗФР); МДП (по 2,5 мкг/0,2 мл ЗФР); КО + F1+ тДНК (по 2,5 мкг + 2,5 мкг/0,2 мл ЗФР соответственно); КО+F1+МДП (по 2,5 мкг + 2,5 мкг/0,2 мл ЗФР соответственно); КО+F1+тДНК+МДП (по 2,5 мкг + 2,5 мкг + 2,5 мкг/0,2 мл ЗФР соответственно). Контролем служили две группы: К1 – интактные животные, К2 – животные получавшие подкожно ЗФР в объеме 0,2 мл. Забор крови у экспериментальных животных всех групп осуществлялся на 3, 7 и 21 сутки, после инокуляции препаратов. Плазму крови получали центрифугированием при 13000 об./мин при 4 °С в течение 10 мин.

Анализ содержания цитокинов в плазме крови осуществляли в трех повторах, при этом значения цитокинов в стандартных калибровочных разведениях, в

контрольных и тестируемых образцах, были воспроизводимы. Концентрация цитокинов в плазме крови выражалась в пкг/мл.

Согласно полученным данным уровень цитокинов в сыворотке крови мышей контрольных групп К1 и К2 достоверно не различался. Не наблюдалось достоверных различий в уровне цитокинов IL-1 α , MIP-2, LIF, Basic FGF, IL-15 в сыворотках крови мышей контрольных и опытных групп.

Установлено, что экспериментальный препарат КО+F1 достоверно ($P < 0,05$) стимулирует продукцию следующих цитокинов: IFN- γ ($P = 0,049$) (на 3 сутки после инокуляции препарата) MIG ($P = 0,046$), TNF- α ($P = 0,049$) (на 7 сутки); VEGF ($P = 0,049$), IL-1 β ($P=0,049$) (на 21 сутки); IL-12 (p70) ($P = 0,046$, $P = 0,033$), GM-CSF ($P = 0,046$, $P = 0,046$) (на 7 и 21 сутки, соответственно).

Препарат тДНК чумного микроба достоверно ($P < 0,05$) оказывает стимулирующее влияние на продукцию цитокинов: IL-18 ($P = 0,049$), MIG ($P = 0,049$) (на 7 сутки); VEGF ($P = 0,049$), IL-1 β ($P = 0,049$), IL-12 (p70) ($P = 0,036$), GM-CSF ($P = 0,049$), IFN- γ ($P = 0,049$) (на 21 сутки).

Синтетический МДП достоверно ($P < 0,05$) стимулирует продукцию цитокинов: M-CSF ($P = 0,049$), VEGF ($P = 0,046$), IL-12 (p40) ($P = 0,049$) (на 3 сутки); MIG ($P = 0,049$), TNF- α ($P = 0,049$) (на 7 сутки); IL-10 ($P = 0,049$), GM-CSF ($P = 0,049$), IFN- γ ($P = 0,049$) (на 21 сутки); IL-12 (p70) ($P = 0,049$, $P = 0,036$) (на 7 и 21 сутки, соответственно).

Сочетание препарата КО+F1 с тДНК достоверно ($P < 0,05$) стимулирует продукцию цитокинов: PDGF-bb ($P = 0,049$), IFN- γ ($P = 0,049$) (на 3 сутки); MIG ($P = 0,049$, $P = 0,049$) (на 3 и 7 сутки); IL-12 (p70) ($P = 0,036$), GM-CSF ($P = 0,049$) (на 21 сутки); VEGF ($P = 0,049$, $P = 0,049$) (на 7 и 21 сутки, соответственно).

Сочетание препарата КО+F1 с МДП достоверно ($P < 0,05$) оказывает стимулирующее влияние на продукцию цитокинов: IL-18 ($P = 0,046$), IL-12 (p40) ($P = 0,049$) (на 3 сутки); VEGF ($P = 0,046$) (на 7 сутки); IL-12 (p70) ($P = 0,036$), GM-CSF ($P = 0,049$), TNF- α ($P = 0,046$) (на 21 сутки).

Комплексный препарат КО+F1+тДНК+МДП достоверно ($P \leq 0,05$) оказывает стимулирующее влияние на продукцию цитокинов: PDGF-bb ($P = 0,049$) (на

3 сутки); VEGF ($P = 0,049$) (на 7 сутки); M-CSF ($P = 0,046$), IL-12 (p70) ($P = 0,036$), GM-CSF ($P = 0,049$) (на 21 сутки) (Таблица 7).

Особо стоит отметить тот факт, что уровень цитокинов IL-12 (p70), VEGF и GM-CSF достоверно ($P < 0,05$) увеличивается после инокуляции каждого из всех перечисленных выше экспериментальных препаратов.

Таблица – 7 Стимулирующее влияние комплексных препаратов на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками белых мышей

Препарат	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	TNF- α	IFN- γ	M-CSF	GM-CSF	BasicFGF	LIF	PDGF-BB	VEGF	MIP-2	MIG	
КО+F1		+							+			+	+		+				+		+	
ТДНК		+							+		+		+		+				+		+	
МДП							+	+	+			+	+	+	+				+		+	
КО+F1 +ДНК									+				+		+				+	+		+
КО+F1 +МДП								+	+		+	+			+				+			
КО+F1 +ТДНК +МДП									+					+	+				+	+		

Примечание: + – достоверно ($P < 0,05$) по сравнению с контролем оказывает стимулирующее влияние на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками белых мышей

Таким образом, результаты, полученные в ходе эксперимента, свидетельствуют о стимулирующем эффекте 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.

Присущая чумному микробу способность уклоняться от иммунологического надзора организма, подавлять реакцию врожденного иммунитета хозяина, во

многим определяется структурой его липополисахарида (ЛПС). При 37 °С *Y. pestis* синтезирует дефектный тетраацелированный ЛПС, который индуцирует снижение продукции моноцитами, макрофагами и дендритными клетками организма хозяина различных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β , IL10, IL-12, ингибирует стимуляцию TLR2, TLR4, TLR9 зависимых сигнальных путей. Таким образом чумной микроб подавляет активацию иммунной системы на ранних стадиях инфекции [151, 204, 220, 382, 399].

Стимуляция TLR2, TLR4, TLR9 рецепторов соответствующими лигандами (PAMPs), приводит к активации синтеза провоспалительных цитокинов IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , INF- γ , колониестимулирующих факторов, и, в конечном итоге, к эффективному провоспалительному антибактериальному ответу [158, 204, 220, 373].

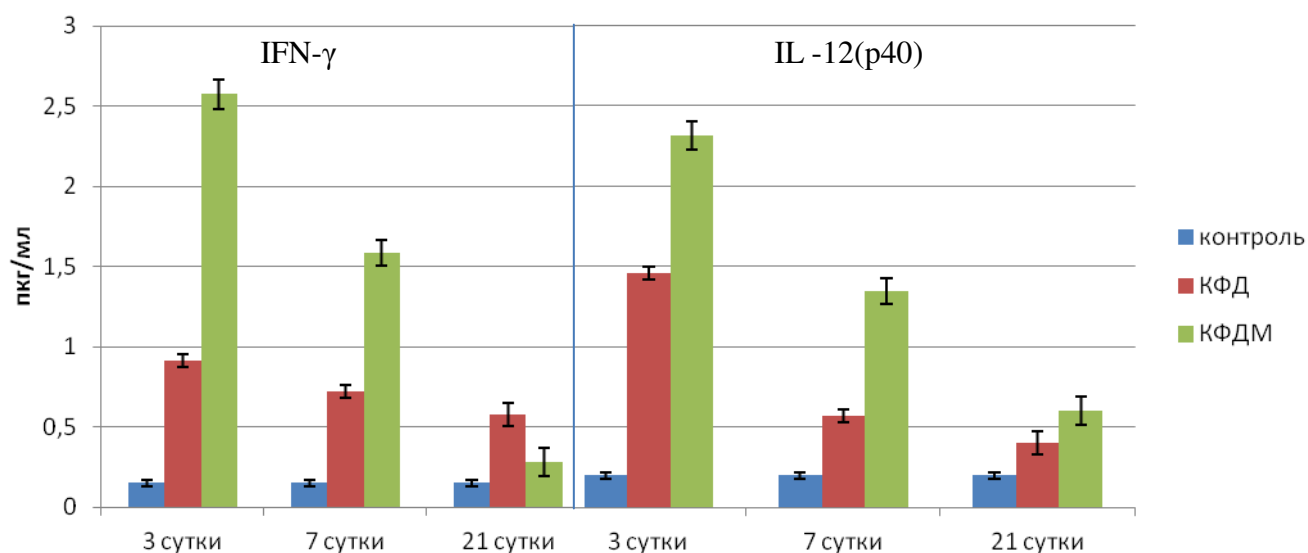
Известно, что цитокины играют существенную роль в INF- γ регуляции, например, IL-12 является ключевым цитокином повышающим T1-дифференциацию. Важность этого цитокина доказана на примере IL-12-и IL-12 рецептор-дефицитных мышей и людей, проявляющих высокую чувствительность к внутриклеточным патогенам [112, 118, 142, 171].

Стимуляция IL-12 происходит в результате активации сигнальных тирозинкиназ Jak2 и Tyk2, которые поочередно фосфорилируют рецептор IL-12, обеспечивая стыковку сайтов для транскрипционного фактора γ STAT4 (сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции 4).

Важная роль STAT4 доказана тем, что большинство функций IL-12 у STAT4^{-/-} мышей нарушено и, что фенотипически соответствовало мышам и людям с дефицитом IL-12 and IL-12R и проявлялось явным снижением продукции INF- γ and T_H1 дифференциацией [142].

Тирозин 693 рецептор-связанного STAT4 фосфорилируется Jak-киназами, что обуславливает димеризацию STAT 4. Димер STAT перемещается в ядро и связывается с промоторным участком генов-мишеней цитокина, вызывая их экспрессию.

При изучении влияния комплекса антигенов чумного микроба на активацию продукции провоспалительных цитокинов IFN- γ и IL-12(p40) в динамике иммунного процесса установлено, что после введения препарата, уровень этих цитокинов максимально повышается к 3 суткам наблюдения ($P < 0,05$). В последующие сроки отмечено снижение продукции IFN- γ и IL-12(p40). Установлено, что антигенный комплекс, состоящий из КО+F1, ДНК, МДП (КФДМ) оказывает достоверно более выраженный стимулирующий эффект на активацию гена STAT 4 у мышей, а значит и продукцию этих провоспалительных цитокинов, чем комплекс КО+F1, ДНК (КФД) на 3 и 7 сутки развития иммунного ответа (Рисунок 9).



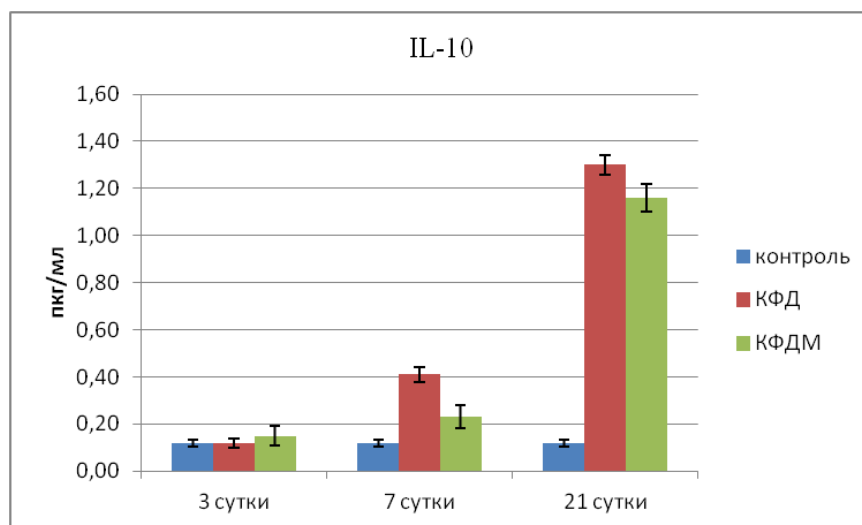
КФД – комплекс антигенов чумного микроба, состоящий из КО+F1+ДНК;

КФДМ– С+F1+ДНК+МДП

Рисунок 9 – Влияние антигенных комплексов чумного микроба на активацию транскрипционного фактора STAT 4

Известно, что реализация патогенного потенциала микроорганизма обусловлена, в том числе, секрецией иммуносупрессивного IL-10, снижением уровня IFN- γ . В опытах *in vitro* установлены высокие значения уровня провоспалительных цитокинов на 3 и 7 сутки наблюдения, в противовес противовоспалительному цитокину IL-10. Продукция IL-10 была снижена в эти сроки под действием антигенных комплексов чумного микроба. Между тем, начиная с 7 суток, происходит ак-

тивация транскрипционного фактора STAT 3, что подтверждается повышением продукции IL-10 в 4,0–5,0 раз на 21 сутки (Рисунок 10).



КФД – комплекс антигенов чумного микроба, состоящий из КС+F1, ДНК;

КФДМ – КС+F1, ДНК и МДП

Рисунок 10 – Влияние антигенных комплексов чумного микроба на активацию IL-10

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 TLR2, NLR2, TLR9 и TLR4 рецепторы, которые являются активаторами сигнальных путей синтеза цитокинов [194, 217, 278]. 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 про-воспалительных цитокинов установлены на 3 сутки. Антигенный комплекс КС+F1, ДНК и МДП, на 3 и 7 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 сутки, препятствует чрезмерному росту показателей воспалительного процесса, вызванного продукцией провоспалительных цитокинов.

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

В работе использовано 150 сертифицированных (НПО «Вектор», Новосибирск) беспородных белых мышей, стандартных по условиям содержания и массе (15–20 г).

Подопытным животным подкожно вводились следующие препараты: группа 1 – F1+КО (12,5 мкг/0,2 мл забуференного физиологического раствора, ЗФР), группа 2 – F1+КО+тДНК *Y. pestis* (по 12,5 мкг + 10 мкг/0,2 мл ЗФР) и группа 3 – F1+КО+МДП (по 12,5 мкг + 10 мкг/0,2 мл ЗФР). Контролем служили белые мыши, получившие ЗФР в объеме 0,2 мл (группа 4). Учет результатов проводился на 3, 7, 14 и 21 сутки. Животные выводились из эксперимента в соответствии с требованиями [52].

В ходе экспериментов установлено, что показатели абсолютного содержания лейкоцитов у экспериментальных животных, иммунизированных F1+КО, F1+КО+тДНК и F1+КО+МДП, находятся в пределах допустимых значений физиологической нормы (от $5,1 \cdot 10^9$ кл/л до $11,6 \cdot 10^9$ кл/л), кроме группы мышей, получивших F1+КО, у которых на 3 сутки наблюдения отмечена лейкопения (Таблица 8).

Таблица 8 – Показатели содержания лейкоцитов в крови мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами

Сроки наблюдения, сутки	Препарат			Контроль
	КО+F1	КО+F1+тДНК	КО+F1+МДП	ЗФР
3	3,0 (2,8–4,4) *	5,1 (4,5–5,7)	5,4 (4,2–7,8)	5,5 (4,8–6,7)
7	6,4 (5,7–7,4)	5,4 (4,9–5,5)	4,2 (4,0–5,3)	
14	5,0 (4,8–5,3)	5,4 (4,7–7,9)	6,7 (5,6–7,6)	
21	5,7 (5,3–5,7)	6,4 (6,3–7,3)	5,1 (4,8–6,1)	

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

Которая может быть обусловлена снижением абсолютного содержания эозинофилов, моноцитов, лимфоцитов и их субпопуляций, что может быть связано с интенсивной миграцией этих клеток в очаг воспаления (Таблица 9).

Таблица 9 – Содержание лейкоцитов в крови мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами

Препарат	Сроки наблюдения, сутки	Ед. изм.	Показатель			
			Моноциты	Общее содержание гранулоцитов	Нейтрофильные гранулоциты	Лимфоциты
FI + КО (n = 7)	3	%	3,0 (1,9–3,5)	33,3 (27,2–34,2)***	31,3 (25,1–33,2)***	58,1 (56,2–61,1)**
		× 10 ⁹ /л	0,08 (0,07–0,93)**	1,03 (0,94–1,42)	0,99 (0,88–1,31)	1,64 (1,53–2,26)**
	7	%	4,2 (3,8–4,9)	23,0 (18,8–23,9)	18,3 (17,1–20,8)	68,8 (66,6–72,8)
		× 10 ⁹ /л	0,27 (0,24–0,39)*	1,39 (1,19–1,88)*	1,31 (1,06–1,49)*	4,93 (4,17–5,28)*
14	%	7,3 (5,6–7,8)***	25,3 (23,5–30,5)*	21,7 (20,7–23,9)*	61,9 (57,12–66,0)*	
	× 10 ⁹ /л	0,31 (0,28–0,37)**	1,24 (1,12–1,46)	1,12 (0,85–1,21)*	2,81 (2,60–3,32)**	
21	%	5,1 (4,5–6,2)**	26,6 (21,9–28,7)*	21,1 (18,7–27,4)*	66,3 (63,2–72,1)	
	× 10 ⁹ /л	0,33 (0,13–0,36)**	1,40 (1,12–1,83)*	1,30 (0,95–1,69)**	3,45 (3,42–3,90)	
FI + КО + гДНК (n = 7)	3	%	1,3 (1,2–1,4)**	18,3 (13,9–19,9)	14,4 (11,3–17,9)	77,7 (75,1–80,7)
		× 10 ⁹ /л	0,07 (0,05–0,13)**	1,25 (0,71–1,27)	1,06 (0,64–1,13)	3,71 (3,11–4,65)
	7	%	3,1 (2,9–3,4)	26,7 (19,3–30,5)**	21,9 (14,8–27,9)*	69,5 (59,6–75,2)
		× 10 ⁹ /л	0,30 (0,16–0,34)	1,57 (1,34–1,81)*	1,46 (1,11–1,77)**	4,02 (2,94–4,67)
14	%	5,1 (3,6–7,1)**	24,2 (21,5–30,7)*	19,6 (16,1–29,3)	64,6 (63,5–67,1)	
	× 10 ⁹ /л	0,31 (0,27–0,62)*	1,44 (1,06–1,71)*	1,21 (0,8–1,4)	3,32 (2,68–4,46)	
21	%	6,5 (5,7–6,7)***	23,1 (18,6–23,7)	20,6 (17,0–21,5)	69,2 (68,7–69,9)	
	× 10 ⁹ /л	0,25 (0,15–0,43)**	1,20 (1,02–1,31)	1,06 (0,99–1,09)	3,96 (2,80–4,36)	
FI + КО + МДП (n = 7)	3	%	2,6 (2,5–2,9)	24,1 (21,8–26,3)*	20,9 (18,3–23,6)	69,5 (67,7–72,4)
		× 10 ⁹ /л	0,18 (0,14–0,25)	1,48 (1,01–1,95)*	1,29 (0,87–1,70)*	3,80 (2,77–4,70)
	7	%	5,2 (4,2–5,8)*	20,3 (16,8–22,7)	17,9 (14,6–20,7)	71,9 (70,9–75,9)
		× 10 ⁹ /л	0,24 (0,17–0,29)*	0,83 (0,65–1,22)	0,73 (0,57–1,12)	3,17 (2,98–3,95)
14	%	4,6 (4,3–5,0)*	21,9 (19,5–23,7)	19,8 (17,1–22,1)	69,1 (66,2–71,4)	
	× 10 ⁹ /л	0,53 (0,44–0,74)**	1,70 (0,73–2,01)*	1,69 (1,10–2,52)**	4,32 (3,49–5,81)	
21	%	3,0 (2,6–5,5)	22,7 (15,9–24,2)	17,3 (14,6–22,9)	66,6 (60,9–75,0)	
	× 10 ⁹ /л	0,18 (0,12–0,25)	0,82 (0,73–1,54)	0,69 (0,67–1,47)	3,45 (2,53–3,53)	
Контроль ЗФР (n = 12)		%	3,8 (2,4–5,0)	18,9 (15,7–25,7)	15,8 (14,5–21,2)	73,6 (66,5–76,9)
		× 10 ⁹ /л	0,16 (0,11–0,29)	0,99 (0,84–1,31)	0,83 (0,73–1,09)	4,14 (3,35–4,58)

Примечание: * – P < 0,05; ** – P < 0,01, *** – P < 0,001 по сравнению с контролем

На фоне перераспределения лейкоцитов у мышей группы 1 наблюдалось увеличение процентного содержания общей популяции гранулоцитов за счет нейтрофилов. Восстановление пула циркулирующих лейкоцитов и их популяций происходит к 7 суткам что свидетельствует о мобилизации клеток костномозгового резерва, при этом выявлено снижение концентрации CD3⁺-клеток и увеличение количества нейтрофилов.

Установлено, что состав клеток крови экспериментальных животных зависит от введенного препарата и сроков наблюдения (Таблица 8, 9).

Так, при анализе лейкоцитограммы у мышей 2 группы на 3 сутки наблюдения выявлена абсолютная моноцитопения (3,0), что обусловлено миграцией этих клеток в место введения. Достоверное увеличение абсолютного и относительного содержания циркулирующих моноцитов отмечено на 14 и 21 сутки у мышей групп 1 и 2, а в отношении группы 3 – на 7 и 14 сутки.

Следует отметить, что у животных, иммунизированных КО+F1, на 14 сутки выявлен умеренный абсолютный нейтрофилез и лимфофилез. Установлено достоверное повышение как абсолютного, так и относительного содержания нейтрофильных гранулоцитов у экспериментальных животных групп 1 и 2, а в случае мышей, получивших препарат КО+F1+МДП, выявлено увеличение числа циркулирующих нейтрофилов на 3 и 14 сутки (Таблица 9). Следует отметить, что наиболее выраженные изменения содержания этих клеток имеют место у мышей, иммунизированных F1+КО.

При анализе динамики субпопуляционного состава лимфоцитов крови мышей, иммунизированных F1+КО+тДНК и F1+КО+МДП, на 3, 7 и 21 сутки зарегистрировано увеличение относительного числа Т-лимфоцитов (Таблица 10). Установлено, что сочетанное применение препарата F1+КО с тДНК или МДП приводит к существенному перераспределению Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов.

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

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

Тем не менее, в случае применения тДНК имеет место увеличение показателей относительного содержания $CD8^+$ -лимфоцитов во все сроки наблюдения, в то время как у мышей группы 3 – на 3 и 7 сутки. Применение комплексного препарата с адьювантами тДНК или МДП также способствуют увеличению относительного содержания Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) на 7 и 21 сутки. Обращает на себя внимание, что у мышей группы 3 на 14 сутки наблюдалось значительное увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов и их субпопуляций ($P < 0,01$) без изменения их значений.

Установлено увеличение, в среднем в два раза по сравнению с контролем (0,26 (0,16–0,33), $P < 0,05$), относительного количества клеток-предшественников кортикальных тимоцитов ($CD3^+CD4^+CD8^+$) во всех экспериментальных группах животных на 3, 7 и 14 сутки наблюдения, а в случае 2 и 3 групп – на 21 сутки.

Показано достоверное ($P < 0,01$) увеличение содержания $CD3^+CD4^-CD8^-$ -клеток на 3 и 14 сутки при сочетанном применении КО+F1 с МДП или КО+F1 с тДНК.

Увеличение численности активированных Т-лимфоцитов, в частности Т-хелперов имело место на 3, 14 и 21 сутки наблюдения у мышей всех экспериментальных групп. Установлено, что препарат F1+КО как *per se*, так и в сочетании с тДНК активирует $CD3^+$ -клетки в большей степени ($P < 0,05$), чем F1+КО+МДП. Существенное возрастание числа активированных $CD3^+CD8^+$ -клеток у мышей, получивших F1+КО и F1+КО+тДНК, выявлено на 21 сутки, в то время как F1+КО+МДП не оказывает влияния на экспрессию CD25 цитотоксическими Т-лимфоцитами (Таблица 10).

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

Корреляционный анализ у экспериментальных животных, получивших F1 + КО, показал взаимосвязь количества лейкоцитов с моноцитами ($r_s = 0,61$, $P = 0,003$), нейтрофилами ($r_s = 0,64$, $P = 0,001$), эозинофилами ($r_s = 0,56$, $P = 0,01$) и

лимфоцитами ($r_s = 0,98$, $P = 0,0001$), а также Т-лимфоцитами ($r_s = 0,87$, $P = 0,0001$), Т-хелперами ($r_s = 0,88$, $P = 0,0001$), $CD3^+CD4^+CD8^+$ ($r_s = 0,50$, $P = 0,02$) и $CD3^+CD4^-CD8^-$ ($r_s = 0,65$, $P = 0,0008$). Следует отметить, что у мышей группы 2 показатели лейкоцитов крови коррелируют только с содержанием лимфоцитов ($r_s = 0,51$, $P = 0,02$), а группы 3 – 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 $CD3^+CD4^-CD8^-$ ($r_s = 0,56$, $P = 0,001$). У мышей иммунизированных экспериментальными препаратами установлены прямые корреляционные связи относительных показателей Т-лимфоцитов с $CD3^+CD4^+$ ($r_s = 0,94$; $0,90$ и $0,91$, $P = 0,0001$) и $CD3^+CD8^+$ -клетками ($r_s = 0,51$; $0,45$ и $0,56$, $P < 0,05$), а также абсолютных значений $CD3^+$ – $CD3^+CD4^+$ ($r_s = 0,96$; $0,89$ и $0,96$, $P = 0,0001$) и $CD3^+$ – $CD3^+CD8^+$ -клетками ($r_s = 0,90$; $0,67$ и $0,81$, $P < 0,001$) и $CD3^+CD4^+$ – $CD3^+CD8^+$ ($r_s = 0,82$; $0,79$ и $0,74$, $P < 0,001$).

В отношении мышей, иммунизированных F1+КО в сочетании с тДНК, зарегистрирована дополнительная корреляция содержания моноцитов, экспрессирующих CD25, с нейтрофилами ($r_s = 0,52$, $P = 0,01$ и $r_s = 0,56$, $P = 0,008$ соответственно). Интересен тот факт, что у мышей группы 2 выявлена корреляционная связь нейтрофилов с $CD3^+CD4^+CD25^+$ ($r_s = -0,45$, $P = 0,04$) и $CD3^+CD25^+$ ($r_s = -0,52$, $P = 0,01$), а у группы 3 – с $CD3^+CD8^+CD25^+$ ($r_s = -0,62$, $P = 0,02$), в то время как у мышей, получивших F1+КО, подобная корреляция отсутствуют.

Нами было показано 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. Так, содержание $CD3^+CD4^-CD8^-$ -клеток коррелирует с $CD3^+CD4^+CD25^+$ -клетками (F1+КО+тДНК – $r_s = 0,46$, $P = 0,04$ и F1+КО+МДП – $r_s = 0,59$, $P = 0,02$), а у мышей, иммунизированных F1+КО содержание $CD3^+CD4^+CD8^+$ и $CD3^+CD4^-CD8^-$ – с числом активированных моноцитов ($r_s = 0,45$, $P = 0,04$ и $r_s = 0,61$, $P = 0,01$). Установлена корреляционная взаимосвязь абсолютного содержания $CD3^+CD4^+CD8^+$ -клеток с $CD3^+CD4^+$ - и $CD3^+CD8^+$ -клетками (F1 + КО – $r_s = 0,52$, $P = 0,01$ и $r_s = 0,60$, P

= 0,003; F1 + КО + тДНК – $r_s = 0,46$, $P = 0,04$ и $r_s = 0,58$, $P = 0,01$; F1 + КО + МДП – $r_s = 0,82$, $P = 0,0001$ и $r_s = 0,72$, $P = 0,003$).

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 так же препаратов туляремийного микроба на продукцию цитокинов и гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [7]. 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 барьерные механизмы системы врожденного иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Чума является особо опасным природно-очаговым инфекционным заболеванием. Учитывая наличие в мире активных природных очагов, регистрацию единичных случаев и вспышек, сопровождающихся высокой летальностью, чума продолжает оставаться серьезной проблемой здравоохранения [46, 65, 266, 267]. В связи с этим, интенсивные исследования возбудителя чумы – *Y. pestis*, в том числе изучение особенностей пато- и иммуногенеза инфекции, продолжают до сих пор. В связи с этим разработка надежных средств, повышающих резистентность организма к чуме является перспективным направлением исследований. Особое внимание уделяется поиску перспективных протективных антигенов и субклеточных фракций *Y. pestis*, подбору эффективных адъювантов и иммуномодуляторов, а так же созданию на их основе искусственных антигенных комплексов для конструирования химических вакцин нового поколения.

Вакцинные препараты такого типа должны оказывать целенаправленное воздействие на иммунную систему организма, обладать повышенной стабильностью, низкой реактогенностью и возможностью применения на фоне профилактики антибиотиками, а так же иметь более продолжительный срок годности [6, 17, 40, 46, 267]. Особое внимание уделяется разработке вакцины, обладающей иммунологической и эпидемиологической эффективностью не только после ревакцинации, но и первичной иммунизации. При создании новых препаратов и вакцин против чумы, необходимо учитывать особенности развития чумной инфекции, в первую очередь, исключительную способность возбудителя уклоняться или подавлять реакцию врожденного иммунитета. В связи с этим перспективным направлением патогенетического обоснования создания эффективной вакцины может стать использование препаратов, целенаправленно воздействующих на этот сегмент иммунной системы организма, несущих так называемые патоген-ассоциированные молекулярные структуры (pathogen associate molecular patterns – PAMPs). Такие структуры распознаются специфическими рецепторами врожден-

ного иммунитета – образ распознающими рецепторами (pattern recognition receptors – PRRs) [17, 38, 215, 235, 266, 271, 298].

Многолетние исследования возбудителя чумы и других грамотрицательных бактерий показали, что наиболее важный протективный антигенный материал (липополисахариды, белки наружной мембраны, пептидогликан и другие PAMPs) сосредоточен в поверхностных структурах бактериальной клетки (капсула, S-слои, наружная мембрана, клеточная стенка и оболочка бактериальной клетки в целом), играющих ведущую роль во взаимодействии микроба с макроорганизмом [5, 18, 113, 174, 288].

Все это и определило необходимость всестороннего изучения механизмов действия антигенных препаратов на иммунокомпетентные клетки экспериментальных животных с применением современных методов, а задача получения сопоставимых данных обусловила проведение экспериментов по единому научно-методическому плану.

С учетом того, что часть протективных антигенов расположена в поверхностных структурах клеток чумного микроба, в настоящей работе был получен ряд препаратов клеточных оболочек, а так же препараты F1 чумного микроба, которые использованы в дальнейшем для создания искусственного антигенного комплекса.

Принимая во внимание способность возбудителя чумы подавлять реакцию врожденного иммунитета, для повышения эффективности комплексных препаратов использованы адъюванты, обладающие 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). Известно, что данные адъюванты являются PAMPs, обладают способностью стимулировать специфические PRRs рецепторы, такие как Toll-подобные рецепторы – TLRs и NLRs (Toll-like receptors (TLR), NOD-like receptors (NLR)), в частности TLR2, NLR2, TLR9 и TLR4, и повышать резистентность макроорганизма [131, 168, 194, 215, 217, 278, 289].

Изоляция поверхностных структур бактериальных клеток, а так же антигенов, как правило, осуществляется из убитых формалином, фенолом или кипячением патогенных бактерий с последующим механическим разрушением клеток, что неизбежно сопровождается снижением иммуногенных свойств получаемых субклеточных фракций.

В связи с этим, для получения объектов исследования с максимальным сохранением иммуногенных свойств, была изучена возможность обеззараживания бактериальной массы *Y. pestis* EV растворами мочевины и цетавлона. Для усиления бактерицидного воздействия раствора мочевины, испытаны добавки в виде 1 % саркозината натрия или 1 % уксусной кислоты.

Показано, что испытанные растворы могут быть использованы для обеззараживания микробной массы и одномоментного получения из нее различных фракций поверхностных антигенов [18, 31].

Объектом исследования избран антигенный препарат (искусственный антигенный комплекс), сконструированный на основе извлекаемых с помощью мочевины и цетавлона клеточных оболочек чумного микроба и фракции 1, который был получен как за счет механического смешивания (в соотношении 1:1 по сухому весу), так и путем химического конъюгирования с использованием глутарового альдегида, а так же сорбции на частицах коллоидного золота.

Препараты КО и капсульного антигена 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 нем свыше 90 % белка, 3 % углеводов, менее 1 % нуклеиновых кислот.

Электрофоретический анализ показал наличие во всех полученных препаратах фракции 1 мажорного полипептида с мол. массой 17 кДа. Однако препарат, выделенный из цетавлонового экстракта, в отличие от антигенов мочевиновых экстрактов, обладал большей гетерогенностью и содержал несколько полипептидов с мол. массами от 29 до 92 кДа.

Исследование химического состава препарата КО показало, что содержание белка в нем 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 мол. массами от 13 кДа до 100 (и несколько выше) кДа, а так же 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 мол. массой 17 кДа является иммунодоминантным компонентом данных препаратов. Дополнительная полоса, с мол. массой 34 кДа, проявляющаяся на реплике, по-видимому, соответствует димеру капсульного антигена.

Реакция с кроличьей чумной антифракционной сывороткой показала, что полученные препараты содержали в своем 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.

Следующим этапом работы являлось исследование протективной активности изолированных субклеточных фракций чумного микроба, адьювантов, искусственных антигенных комплексов.

Из всех полученных субклеточных фракций клеток *Y. pestis* выраженной протективной активностью обладали препараты, полученные обработкой 0,0625 % раствором цетавлона (с последующей обработкой ДОХ) выращенные при 37 °С – КО (препарат 8) и F1 (препарат 4) (ImD_{50} = 11 и 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 оказывали статистически значимого воздействия на протективную активность субклеточных фракций чумного микроба.

Показана протективная активность комплексов КО и F1 *Y. pestis* EV при однократном парентеральном введении в тесте защиты белых мышей при заражении их через 21 сутки после иммунизации культурой *Y. pestis* И-2683 в дозе 200 LD₅₀. Установлено, 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.

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

В ходе исследования было установлено, что прижизненная обработка клеток чумного микроба растворами мочевины и цетилтриметиламмоний 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, препарат суммарной ДНК возбудителя чумы и МДП увеличивают иммунологическую эффективность субклеточных фракций чумного микроба, что указывает на перспективность использования этих иммуномодуляторов, в качестве адъювантов при конструировании химических вакцин против чумы. Полученные нами сведения об иммуностимулирующей активности ДНК чумного микроба согласуются с данными E. D. Williamson с соавт. [41] об усилении плазмидной ДНК иммунного ответа мышей на введение V-антигена *Y. pestis*.

Следующим этапом работы являлось изучение состояния кислородзависимого, нитроксидзависимого и кислороднезависимого метаболизма клеток фагоцитарной системы белых мышей *in vitro* под действием препарата и в сочетании с тДНК чумного микроба (total DNA) или синтетическим мурамилдипептидом (Muramyl dipeptide (MDP)), являющихся известными лигандами PRRs (таких, как Toll-подобные рецепторы –TLRs и NLRs [194, 217, 289].

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

Значения индекса стимуляции продукции NO фагоцитами, обработанными комплексом антигенных детерминант в сочетании с адъювантами, были положительными. 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 ± 2,4) и КО+F1+МДП (31,2 ± 1,9). Между фагоцитами обеих клеточных популяций, обработанных по отдельности КО+F1, ДНК, МДП, достоверных различий выявлено не было. Также установлено, что в лейкоцитах, стимулированных экспериментальными препаратами образование NO₂ происходит интенсивнее в среднем в 3,0 раза, чем в перитонеальных макрофагах (P < 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 выразилось 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 достоверно ($P < 0,05$) превышали аналогичные показатели у фагоцитов, инкубированных по отдельности с КО+F1, МДП и ДНК в 2,7; 3,8 и 3,4 раза, соответственно. После воздействия субклеточных фракций чумного микроба уровень продукции активных кислородных радикалов перитонеальными макрофагами был в 2,4–4,6 раза выше ($P < 0,05$).

Таким образом, комплексный препарат на основе антигена и клеточных оболочек в сочетании с ДНК чумного микроба и МДП в условиях *in vitro* стимулируют активность бактерицидных систем фагоцитов как кислородзависимых, так и кислороднезависимых.

Следующим этапом работы являлось изучение цитокинового статуса иммунокомпетентными клетками экспериментальных животных под действием экспериментальных препаратов на основе F1-антигена, клеточных оболочек (F1+КО) и тотальной ДНК (тДНК) *Y. pestis*, а также синтетического мурамилдипептида (МДП).

Установлено, что уровень цитокинов в сыворотке крови мышей контрольных групп К1 и К2 достоверно не различался. Не наблюдалось также достоверных 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) достоверно увеличивались после инокуляции всех перечисленных выше экспериментальных препаратов.

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.

Установлено, что, комплексный препарат на основе F1-антигена и клеточных оболочек в сочетании с адьювантами (тДНК чумного микроба, МДП) способствует стимуляции TLR2, NLR2, TLR9 и TLR4 рецепторов, которые являются активаторами сигнальных путей синтеза цитокинов [217, 278, 289].

Следующим этапом работы являлось изучение влияния препарата субклеточных фракций чумного микроба и адьювантов на функциональное состояние и субпопуляционный состав клеток крови белых мышей.

В ходе эксперимента установлено, что изменение состава клеток крови экспериментальных животных зависит от введенного препарата и сроков наблюдения. В процессе исследования нами было установлено, что показатели абсолютного содержания лейкоцитов у экспериментальных животных, иммунизированных F1+КО, F1+КО+тДНК и F1+КО+МДП, находились в пределах допустимых значений физиологической нормы (от 5,1 до 11,6 $\cdot 10^9$ кл/л). Однако, у групп мышей, получивших F1+КО, отмечалась лейкопения (на 3 сутки), обусловленная снижением абсолютного содержания эозинофилов, моноцитов, лимфоцитов и их субпопуляций, что может быть связано с интенсивной миграцией этих клеток в очаг воспаления. Установлено достоверное 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 14 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, иммунизи-

ванных F1+КО+тДНК и F1+КО+МДП, показал увеличение относительного числа Т-лимфоцитов (на 3, 7 и 21 сутки), а так же 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 7 сутки). Препарат тДНК, а та же МДП способствуют увеличению относительного содержания Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) (на 7 и 21 сутки). Следует отметить, что у мышей группы 3 на 14 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, 7 и 14 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 сутки). В случае сочетанного применения F1+КО с МДП или тДНК, показано достоверное (P < 0,01) увеличение содержания CD3⁺CD4⁻CD8⁻-клеток (на 3 и 14 сутки).

Для оценки степени активации Т-лимфоцитов и моноцитов нами был проведен сравнительный анализ экспрессии рецептора IL-2 (CD25), отражающего способность клеток к пролиферации и дифференцировке [3].

Как показали исследования, у мышей всех экспериментальных групп наблюдалось увеличение численности активированных Т-лимфоцитов, в частности Т-хелперов (на 3, 14 и 21 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 сутки, в то время как F1+КО+МДП не оказывает существенного влияния на экспрессию CD25 цитотоксическими Т-лимфоцитами. Анализ экспрессии CD25 моноцитами и макрофагами крови показал, что сочетанное приме-

нение препарата F1+КО с тДНК или МДП приводит к снижению их содержания в ранние сроки наблюдения (3 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 группы 3 – 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 $CD3^+CD4^-CD8^-$ ($r_s = 0,56$, $P = 0,001$).

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. Группа экспериментальных животных, иммунизированных препаратом F1 + КО в сочетании с тДНК, показали 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 группы 3 – 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 сопряженности между клетками иммунной системы и свидетельствуют об интенсивной иммунной реакции.

Таким образом, комплексный препарат на основе F1-антигена и КО, а также его сочетанное применение с тДНК или МДП повышает пролиферацию предшественников тканевых макрофагов и гранулоцитов, что, в свою очередь, согласуется с ранее полученными нами данные о стимулирующем влиянии этих препаратов

на продукцию цитокинов и GM-CSF [9]. Также следует отметить увеличение содержания Т-хелперов, экспрессирующих CD25, при иммунизации мышей экспериментальными препаратами, что указывает на повышение пролиферативной активности этих клеток. Это обстоятельство является важным, поскольку возбудитель чумы блокирует механизмы системы врожденного иммунитета и препятствует формированию макроорганизмом полноценного адаптивного иммунитета.

При разработке современных препаратов и вакцин против чумы необходимо учитывать особенности развития инфекции [6, 65]. Способность чумного микроба подавлять реакцию врожденного иммунитета хозяина, а так же уклоняться от иммунологического надзора организма, определяется, во многом, структурой его ЛПС. Так, *Y. pestis* при 37 °С синтезирует дефектный тетраацелированный ЛПС, который индуцирует снижение продукции моноцитами, макрофагами и дендритными клетками организма хозяина различных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β , IL10, IL-12, а так же ингибирует стимуляцию TLR2, TLR4, TLR9 зависимых сигнальных путей, подавляя, таким образом, активацию иммунной системы на ранних стадиях инфекции [217, 278, 289].

Анализируя результаты исследований можно констатировать, что комплексный препарат на основе КО и F1-антиген *Y. pestis*, содержащие липополисахарид, пептидогликан и другие PAMPs, обладает высокой протективной активностью для белых мышей. Адьюванты тДНК и МДП, повышающие функциональную активность клеток иммунофагоцитарной системы, также являются PAMPs и лигандами PRRs: TLRs и NLRs подобных рецепторов и способны активировать механизмы иммунологической защиты организма [21, 25, 112, 217]. В связи с чем, изучение антигенов *Y. pestis*, совместно с адьювантами, с целью получения высокоиммуногенных препаратов, обеспечивающих адекватное целенаправленное воздействие на иммунную систему макроорганизма, является актуальным направлением [3, 6].

Препарат КО+F1-антиген *Y. pestis*, в сочетании с адьювантами, обладает способностью стимулировать TLR2, NLR2, TLR9 и TLR4 рецепторы, что, в свою очередь, приводит к активации синтеза провоспалительных цитокинов IL-1, IL-2,

IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , INF- γ , колониестимулирующих факторов, и, в конечном итоге, к эффективному провоспалительному антибактериальному ответу. Он обеспечивает целенаправленное действие на иммунную систему макроорганизма и может быть пригоден в качестве кандидата для создания эффективной вакцины, способной активировать врожденный иммунитет и стимулировать формирование адаптивного иммунного ответа организма [9, 20, 22, 25, 112, 194, 217]. На сегодняшний момент, несмотря на большие достижения в борьбе с чумой, проблема специфической профилактики этой инфекции остается актуальной и требует всестороннего изучения механизмов взаимодействия как самого патогена, так и его антигенов с макроорганизмом [4, 6, 65].

На основании вышеизложенного и данных литературы нами предложена концептуальная схема 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 обладает выраженной иммуногенной активностью.

Безусловно, важен факт успешного применения этого антигенного препарата в качестве средства, повышающего резистентность организма экспериментальных животных в отношении *Y. pestis*. С учетом данных литературы об иммуногенных свойствах F1-антигена чумного микроба, материалов о роли *Y. pestis* на неспецифическую резистентность организма экспериментальных животных представляется возможным гипотетически сформулировать комплекс факторов, обеспечивающих иммунокоррегирующее действие экспериментального препарата, включающего F1-антиген и клеточные оболочки *Y. pestis*, а также в сочетании с адьювантами (тДНК и МДП) на иммунокомпетентные клетки макроорганизма. 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.

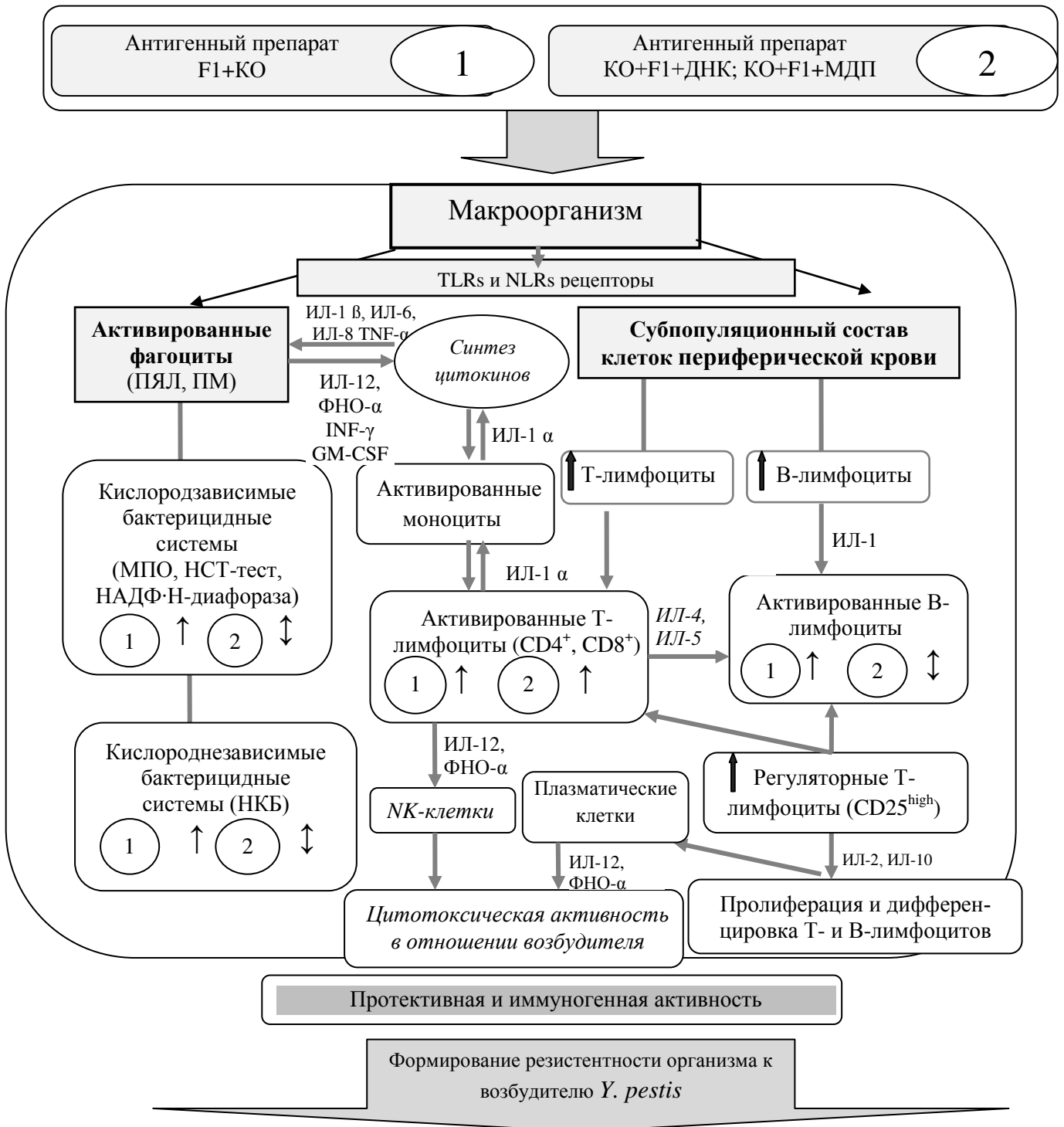


Рисунок 11 – Концептуальная схема механизмов действия антигенного препарата *per se* и в сочетании с адьювантами на функциональное состояние клеток иммунной системы экспериментальных животных

Активированные моноциты синтезируют ИЛ-1 α , 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 ведет к элиминации возбудителя.

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

Таким образом, полученные результаты в ходе диссертационного исследования, 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 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 % 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.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ	– антиген
АТ	– антитело
АФК	– активные формы кислорода
АФА	– активные формы азота
бДНК	– бактериальная дезоксирибонуклеиновая кислота
БСА	– бычий сывороточный альбумин
Г6ФДГ	– глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГА	– глутаровый альдегид
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДК	– дендридные клетки
ЗФР	– забуференный 0,9 % раствор хлористого натрия рН 7,2
ИД	– иммунизирующая доза
ИЗФ	– индекс завершенности фагоцитоза
ИЛ-	– интерлейкины (1, 4, 6, 10 и т.д.)
ИФА	– иммуноферментный анализ
IFN- γ	– интерферон гамма
КЗМ	– кислородзависимый метаболизм
кДа	– килодальтон
КО	– клеточные оболочки
КОЕ	– колониеобразующая единица
ЛВИ	– лейко-В-клеточный индекс
ЛД ₅₀ (LD ₅₀)	– доза испытуемого агента, вызывающая гибель 50 % взятых в опыт животных
ЛПС	– липополисахарид
ЛПС _т	– липополисахарид, полученный твин-экстракцией
ЛПС _ф	– липополисахарид, полученный водно-фенольным методом
ЛТИ	– лейко-Т-клеточный индекс

МДП	– мурамилдипептид
мкМ	– микромоль
мМ	– миллимоль
м.м.	– молекулярная масса
МПО	– миелопероксидаза
МФ	– макрофаг
МФЛ	– монофосфорил липид А
НАДФ	– никотинамидадениндинуклеотид фосфат
НАДФ·Н	– никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный
НСТ- тест	– тест с нитросиним тетразолием
НКБ	– неферментные катионные белки
НЧС	– нормальная человеческая сыворотка
ОСА	– основной соматический антиген
ПАФ	– процент активных фагоцитов
ПВИ	– поливинилимидазол
ПМ	– перитонеальные макрофаги
п.н.	– пар нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЯЛ	– полиморфноядерные лейкоциты
СМФ	– система мононуклеарных фагоцитов
СОД	– супероксиддисмутаза
СС	– β -подкласс хемокинов
СХС	– α -подкласс хемокинов
mРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
ФИ	– фагоцитарный индекс
TNF- α	– фактор некроза опухолей альфа
ФП	– формазанположительные клетки
ФС	– фосфатидилсерин

ЦПА	– цитохимический показатель активности
ЯМР	– ядерно-магнитный резонанс
7-AAD	– 7-амино-актинолизин
АсрА	– кислая фосфатаза
Alexa-700	– флуорохромный краситель
AnV	– аннексин V
APCs	– антиген презентирющие клетки
APC	– аллофикоцианин
ASC	– ассоциированный с апоптозом протеин
Bcl-2	– белок семейства Bcl-2, ингибирующий апоптоз
Bid	– белок семейства Bcl-2, активирующий апоптоз
CD	– кластер дифференциации
CpG	– cytosine-phosphate-guanosine цитозин-фосфат-гуанозин
CpG-ОДН	– CpG- олигодинуклеотиды
Cy	– цианин
DC	– дендритные клетки
Dcl	– доза антигена, вызывающая гибель 100 % животных
F1	– фракция 1
FITC	– флуоресцеинизотиоцианат
FSC	– малоугловое светорассеивание
Gro	– онкоген, связанный с ростом
GM-CSF	– гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, англ. colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage), GM-CSF)
Ig	– иммуноглобулин
IL-	– интерлейкины (1, 4, 6, 10 и т.д.)
iNOS	– индуцибельная NO-синтаза
IP-10	– белок, индуцированный IFN- γ
KDO	– 3-дезоксид-D-манно-октулозоновая кислота

LAL	– тест на бактериальные эндотоксины
LBP	– белок, связывающий ЛПС
LVS	– живой вакцинный штамм
MALDI-TOF MS	– матричная лазерная десорбционная ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия
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
NK-клетки	– натуральные киллеры
NO	– окись азота
NOS	– фермент NO-синтаза
PAMPs	– патоген-ассоциированная молекулярная структура (pathogen associate molecular patterns)
PE	– фикоэритрин
PRRs	– образ-распознающие рецепторы
RANTES	– хемокин, секретируемый Т-лимфоцитами
SSC	– боковое светорассеивание
subsp.	– подвида (subspecies)
Tfp	– гены, необходимые для биогенеза системы секреции IV типа
TLR	– Toll-подобный рецептор
TNF- α	– фактор некроза опухоли
VEGF	– фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апарин, Г.П. Микробиология чумы (руководство) / Г.П. Апарин, Е.П. Голубинский // Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та. – 1989. – 92 с.
2. Атауллаханов, Р.И. Адъюванты в составе вакцин: Масляные эмульсии, липосомы, виросомы, археосомы, экзосомы / Р.И. Атауллаханов, Р.М. Хаитов // Иммунология. – 2011. – Т. 32, № 2. – С. 101–109.
3. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев – Л.: Изд-во медицинской лит., 1962. – 180 с.
4. Баринский, И.Ф. Экспериментальные подходы к разработке мукозальных вакцин при вирусных заболеваниях, передающихся половым путем / И.Ф. Баринский, В.А. Ляшенко, Л.М. Алимбарова // Иммунология. – 2013. – № 2. – С. 119–112.
5. Бывалов, А.А. Иммунобиологические свойства антигенов *Yersinia pestis* / А.А. Бывалов, Ю.С. Оводов // Биоорганическая химия. – 2011. – Т. 37, № 4. – С. 452–463.
6. Бывалов, А.А. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы / А.А. Бывалов, В.В. Кутырев // Журн. микробиол. – 2011. – № 2. – С. 97–105.
7. Вакцины с адъювантами. Доклинические исследования / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, В.П. Бондарев и др. // Биопрепараты. – 2015. – № 1. – С. 15–20.
8. Гендон, Ю.З. Высокая эффективность и безопасность вирусных вакцин и бездоказательная критика // Вопросы вирусологии. – 2013. – № 6. – С. 5–13.
9. Голубинский, Е.П. Активность бактерицидных систем фагоцитов у интактных и иммунизированных против туляремии морских свинок / Е.П. Голубинский, И.С. Бойкова, В.И. Дубровина // Журн. микробиол. – 1995. – № 2. – С. 77–79.

10. Два простых метода выделения ДНК из различных источников с применением цетавлона / В.И. Нактинис, Н.Е. Малеева, Д.Ф. Санько и др. // Биохимия. – 1977. – Т. 42, № 10. – С. 1783–1789.
11. Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения РД 42-28-8-89 // М.: М-во. здравоохранения СССР. – 1989. – 31 с.
12. Дыкман, Л.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев // Успехи химии. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 199–213.
13. Изменение активности миелопероксидазы и кислой фосфатазы в нейтрофилах периферической крови человека при стимуляции клеток *in vitro* / Т.Л. Бурая, А.А. Бутаков, В.А. Дрожеников и др. // Журн. микробиол. – 1991. – № 10. – С. 52–55.
14. Изменение функциональной активности макрофагов под влиянием бактериальных мурамилпептидов / М.И. Карсонова, А.И. Ильинская, В.Л. Львов и др. // Журн. микробиол. – 2007. – № 3. – С. 34–37.
15. Иммуногенные и протективные свойства липополисахаридов *Shigella flexneri* 2a с химически модифицированным липидом А / В.А. Лёдов, М.Э. Головина, Н.Н. Лучина и др. // Иммунология. – 2015 – № 2. – С. 99–104.
16. Иммуногенные и протективные свойства поверхностных антигенов б и d *Burkholderia pseudomallei* / И.В. Авророва, И.И. Корсакова, С.И. Жукова и др. // Журн. микробиол. – 2010. – № 3. – С. 40–44.
17. Исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы / С.А. Бугоркова, З.Л. Девдариани, Т.Н. Щуковская и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013 – № 3. – С. 63–69.
18. К характеристике иммуногенности конъюгированных антигенов чумного микроба / Е.П. Голубинский, Б.Д. Рублев, Л.Г. Герасюк и др. // Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций: тезисы докладов к Всесоюзной научной конференции специалистов противочумных учреждений. – Иркутск, 1984. – Ч. II. – С. 20–21.

19. Капсульный антиген чумного микроба / Л.А. Кадникова, П.Х. Копылов, С.В. Дентовская и др. // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Т. 5, № 3. – С. 201–218.
20. Клинико-иммунологическая эффективность и перспективы использования мурамилдипептидов в лечении атопических заболеваний / И.Г. Колесникова, С.В. Козлов, Е.А. Гурьянова и др. // Медицинская иммунология. – 2016. – Том 18, № 1. – С. 15–20.
21. Козлов, И.Г. Лекарственные воздействия через рецепторы врожденного иммунитета / И.Г. Козлов, Т.М. Андропова // Аллергология и иммунология. – 2013. – № 4. – С. 254–259.
22. Колесникова, Н.В. Иммуностропные эффекты глюкозаминилмурамилдипептида при герпетической инфекции у детей / Н.В. Колесникова, Т.М. Андропова // Вопросы практической педиатрии. – 2016. – № 5. – С. 56–61.
23. Колесникова, О.Б. Закономерности формирования резистентности организма к *Bacillus anthracis* под влиянием искусственного антигенного комплекса сибиреязвенного микроба: автореферат дис. ... канд. биол. наук: 14.00.16. – Иркутск, 2008. – 22 с.
24. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. Методические указания 3.3.2.2124–06. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. – 35 с.
25. Кубанов, А.А. Распознающие рецепторы врожденного иммунитета (толл-подобные рецепторы) в патогенезе заболеваний кожи / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Цитокины и воспаление. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 11–17.
26. Кузнецова, К.А. Инструктивно-методические материалы по применению серологических методов диагностики при эпизоотологическом обследовании природных очагов чумы / К.А. Кузнецова, М.И. Леви. – М., 1983 – 136 с.
27. Кузнецова, К.А. Основные направления совершенствования серологических исследований при эпидемиологическом надзоре в природных очагах чумы

СССР / К.А. Кузнецова, Н.И. Хотько, В.И. Иванов // Иммунология и профилактика особо опасных инфекций. – Саратов, 1982. – С. 3–7.

28. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: ЭАО Медицина, Шико, 2009. – 472 с.

29. Леви, М.И. Эритроцитарные диагностикумы и их применение в серологии / М.И. Леви, Н.Н. Басова // Пробл. особо опасных инфекций. – 1970. – Т. 2, № 12. – С. 207–213.

30. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук // Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.

31. Марков, Е.Ю. Проблемы и перспективы совершенствования средств специфической профилактики инфекционных болезней / Е.Ю. Марков, Е.П. Голубинский, Л.Я. Урбанович // Журн. инфекционной патологии. – 1998. – Т. 5, № 4. – С. 3–6.

32. Медведева, С.А. Стратегия модификации и биопотенциал природного полисахарида арабиногалактана / С.А. Медведева, Г.П. Александрова // Панорама современной химии России. Синтез и модификация полимеров. – М., 2003. – С. 328–356.

33. Методические рекомендации по контролю питательных сред по биологическим показателям / З.М. Андреева, Л.Г. Бендас, Е.А. Ельчинова, и др. – М., 1980. – 15 с.

34. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания 4.2.2316–08. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.

35. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов: Методические указания, МУ, 4.1/4.2.588–96. – М., 1996. – 70 с.

36. Мещерякова, Е.А. Сигнальные клеточные пути и белковые взаимодействия, индуцированные мурамоилпептидами / Е.А. Мещерякова, Т.М. Андропова, В.Т. Иванов // Биоорг. хим. – 2010. – Т. 36, № 5. – С. 581–595.

37. Микшис, Н.И. Прототипы сибиреязвенных вакцин на основе генно-инженерных бациллярных штаммов и синтезируемых ими антигенов: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 03.00.07, 03.00.15. – Саратов, 2009. – 46 с.

38. Микшис, Н.И. Современные тенденции в конструировании рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы / Н.И. Микшис, О.М. Кудрявцева, В.В. Кутырев // Журн. микробиол. – 2015. – № 3. – С. 116–126.

39. Милютин Л.Н. Опыт применения Ликопида для санации постинфекционного сальмонеллезного бактерионосительства у детей / Л.Н. Милютин, А.О. Голубев // Российский Вестник Перинатологии и Педиатрии. – 2015. – № 4. – С. 100–107.

40. Молекулярные основы вакцинопрофилактики чумы / С.В. Дентовская, П.Х. Копылов, С.А. Иванов и др. // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2013 – №3. – С 3–12.

41. Наумов, А.В. Лабораторная диагностика чумы / А.В. Наумов, Л.В. Самойлова. – Саратов. 1992. – 24 с.

42. Никитина, Т. Н. Иммуноадьювантное действие цитокинов / Т. Н. Никитина, Ж. И. Авдеева // Биопрепараты. – 2008. – № 3. – С. 16–20.

43. Новый способ получения липополисахарида возбудителя чумы / Т.А. Полунина, Н.П. Гусева, И.А. Кузьмиченко, и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – Вып. 3. – С. 100–103.

44. Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение № 4), Приказ № 742 Министерства высшего и среднего специального образования СССР от 13 ноября 1984 г.

45. Определение функциональной активности лейкоцитов периферической крови в качестве показателя неспецифической защиты организма / Л.М. Сомова, Н.Г. Плехова, Н.М. Кондрашева и др. – Методические рекомендации. – Владивосток, 2005. – 24 с.

46. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации: Методические указания, МУ,

1.3.1098-02. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора МЗ России, 2002. – 103 с.

47. Организация работы и обеззараживание материала, содержащего возбудителя чумы при проведении исследований методом проточной цитофлуориметрии / В.В. Кутырев и др. – Методические рекомендации. – Саратов, 2008. – 22 с.

48. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности: Методические указания, МУ 1.3. 2569-09. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2010. – 38 с.

49. Особенности штаммов возбудителя чумы, не продуцирующих основного капсульного антигена F1, и апробация отдельных методов их детекции / Т.Е. Арсеньева, А.Л. Трухачёв, Е.А. Васильева и др. // *Universum: химия и биология*. – 2014. – №8 (8). – С. 2–13.

50. Остерман, Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1983. – 304 с.

51. Патент РФ № 2921817, МКИ⁵ А 61 К 39/106. Способ получения вакцины против холеры / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, А.В. Некрасов, и др.; Ин-т иммунологии. – № 4942893/13; Заявл. 05.06.91; Оpubл. 30.10.94, Бюл. № 20. – 5 с., Приоритет 05.06.91.

52. Патент США № 4713240, МКИА 61 К 39/08. Vaccines based on insoluble supports / Wilkins T.D., Lyeiry D.M.; Research Corpor., New York, N.Y. – № 719775; Заявл. 04.04.85; Оpubл. 15.12.87.

53. Патент США № 5112606, МКИ⁵А 61 К 39/395, С 07 К 15/28. Method of producing antibodies using colloidal metal as carrier / Shiosaka Sadao (Япония). – № 414608; Заявл. 29.09.89; Оpubл. 12.05.92; Приор. 10.01.86; № 61–3825 (Япония).

54. Пащенко, М.В. Роль интерлейкина-1 и митоген-активируемых протеинкиназ в механизмах действия мурамилпептидов на клетки врожденного имму-

нитета / М.В. Пащенко, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2015. – № 4. – С. 196–200.

55. Петров, Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 608 с.

56. Пигаревский, В.Е. К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторно-диагностической практике / В.Е. Пигаревский, Ю.А. Мазинг // Лаб. дело. – 1981. – № 10. – С. 579–582.

57. Полтавченко, А.Г. Использование зольей серебра как маркеров иммуоанализа на микротитровальных планшетах / А.Г. Полтавченко, В.С. Караваев, Ф.В. Тузиков // Журн. микробиол. – 1998. – № 2. – С. 108–111.

58. Препаративный метод выделения и очистки капсульного антигена возбудителя чумы при помощи изоэлектрической преципитации / М.М. Титенко, В.И. Вейнблат, М.С. Веренков, и др. // Диагностика и профилактика особо опасных инфекций. – Саратов. – 1983. – С. 34–39.

59. Протективная активность поверхностных антигенных фракций *Yersinia pestis* и их комплексов / Е.Ю. Марков, Е.П. Голубинский, В.Б. Николаев и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2002. – № 3. – С. 122–125.

60. Разработка реагента для оценки начальной стадии иммунного ответа на живую чумную вакцину / П.Н. Дерябин, Б.В. Каральник, Т.Г. Денисова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 102–106.

61. Результаты изучения иммуногенной активности клеточных оболочек *Francisella tularensis* разных подвигов / А.В. Корнева, В.Б. Николаев, К.Ю. Ястремская и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2015. – Т. 11, № 101. – С. 63–66.

62. Ромашевская, Е.И. Влияние разных субклассов перитонеальных макрофагов на антителообразование в культуре / Е.И. Ромашевская, Э.Л. Хасман, Д.Р. Каулен // Иммунология. – 1981. – № 2. – С. 21–25.

63. Санитарные правила «Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.3118-13. – М., 2014. – 195 с.

64. Санитарные правила «Медицинские иммунобиологические препараты. Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобио-

логических препаратов». СП 3.3.2.561-96. утв. постановлением госкомэпиднадзора РФ от 31.10. 96 № 33 96. – М., 1996.

65. Саяпина, Л.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций / Л.В. Саяпина, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 107–110.

66. Свешников, П.Г. Функции белков теплового шока в системе адаптивного иммунитета. Конструирование вакцин / П.Г. Свешников, В.В. Малайцев, В.И. Киселев // Журн. микробиол. – 2007. – № 6. – С. 108–117.

67. Семакова, А.П. Адьювантные технологии в создании современных вакцин / А.П. Семакова, Н.И. Микшис // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 28–35.

68. Специфическая профилактика холеры в современных условиях Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев, Т.Н. Щуковская, и др. // Пробл. особо опасных инфекций. – 2011. – № 107. – С. 5–12.

69. Спирин, А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот / А.С. Спирин // Биохимия. – 1958. – Т. 23, вып. 5. – С. 656–662.

70. Структура и иммуномодулирующее действие арабиногалактана лиственницы сибирской и его металлопроизводных / В.И. Дубровина, С.А. Медведева, С.А. Витязева и др. – Иркутск: Аспринт, 2007. – 145 с.

71. Супотницкий, М.В. Бактериальные токсины. Их природа, механизмы действия, возможности конструирования гибридных и модифицированных токсинов / М.В. Супотницкий // Биопрепараты. – 2011. – № 1. – С. 6–15.

72. Тимофеева, Л.А. Учебно-методическое пособие по лабораторной диагностике и изучению биологических свойств чумного микроба и возбудителей некоторых других природно-очаговых инфекций / Л.А. Тимофеева, Г.П. Апарин, В.Я. Головачева. – Иркутск, 1972. – 72 с.

73. Федорова, В.А. Иммунохимическая характеристика фракции I штаммов *Yersinia pestis*, дефектных по гену *cafIM* / В.А. Федорова, З.Л. Девдариани // Молек. генетика, микробиол. и вирусол. – 2002. – № 1. – С. 11–17.

74. Федосеенко, М.В. Эпоха конъюгированных вакцин: международный опыт успешного применения / М.В. Федосеенко, М.Г. Галицкая, Л.С. Намазова // Педиатрическая фармакология. – 2008. – Т. 5, № 6. – С. 8–14.
75. Фирстова, В. В. Иммунологические аспекты чумы / В.В. Фирстова, И.А. Дятлов, А. В. Караулов // Иммунология. – 2016. – № 1. – С. 61–63.
76. Фрейдлин, И.С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека / И.С. Фрейдлин // Учебное пособие. – Л., 1986. – 37 с.
77. Фрейдлин, И.С. Система мононуклеарных фагоцитов / И.С. Фрейдлин // М.: Медицина, 1984. – 272 с.
78. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р.М. Хаитов // 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 496 с.
79. Хаитов, Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие / Р.М. Хаитов // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 280 с.
80. Хансон, Р. Химический состав бактериальной клетки. Методы общей бактериологии / Р. Хансон, Дж. Филлипс // Пер. с англ. в 3-х т. – М.: Мир, 1984. – Т. 2. – С. 283–373.
81. Чард, Т. Радиоиммунологические методы / Т. Чард // Пер. с англ. Морозовой М. С., под ред. Варшавского Я.М. – М.: Мир, 1981. – 248 с.
82. Чувствительность чумного микроба из сибирских природных очагов к антибактериальным препаратам *in vitro* / С.В. Балахонов, С.А. Белькова, Е.Г. Токмакова и др. // Клин. лаб. диагностика. – 2013. – №4. – С 36–40.
83. Экспериментально-морфологическая характеристика действия конъюгированных антигенов чумного микроба / Е.П. Голубинский, Р.С. Колесник, Б.Д. Рублев и др. // Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций: тезисы докладов к Всесоюзной научной конференции специалистов противочумных учреждений. – Иркутск, 1984. – Ч. II. – С. 17–19.
84. A comparative study of cationic liposome and noise-based adjuvant systems for protein subunit vaccines: characterisation, environmental scanning electron mi-

croscopy and immunisation studies in mice / A. Vangala, D. Kirby, I. Rosenkrands et al. // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 58, N 6. – P. 787–799.

85. A CpG-ficoll nanoparticle adjuvant for anthrax protective antigen enhances immunogenicity and provides single-immunization protection against inhaled anthrax in monkeys / M.A. Kachura, C. Hickie, S.A. Kell et al. // *Journ. of immunol.* – 2016. – Vol. 196, N 1. – P 284–297.

86. A DNA vaccine against tuberculosis based on the 65 kDa heat-shock protein differentially activates human macrophages and dendritic cells / L.H. Franco, P.F. Wolk, C.L. Silva et al. // *Genet. Vaccines Ther.* – 2008. – Vol. 6. – P. 3.

87. A heterologous prime-boost vaccination strategy comprising the *Francisella tularensis* live vaccine strain capB mutant and recombinant attenuated *Listeria monocytogenes* expressing *F. tularensis* IglC induces potent protective immunity in mice against virulent *F. tularensis* aerosol challenge / Q. Jia, R. Bowen, J. Sahakian et al. // *Infect. Immun.* – 2013. – Vol. 81, N 5. – P 1550–1561.

88. A monoclonal antibody-based immunoassay to measure the antibody response against the repeat region of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* / K. Radin, F. Clement, E Jongert et al. // *Malaria Journal.* – 2016. – Vol. 15. – P. 543.

89. A Nontoxic adjuvant for mucosal immunity to Pneumococcal surface protein A / M. Yamamoto, D.E. Briles, S. Yamamoto et al. // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161, N 8. – P. 4115–4121.

90. A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties / U. Samulowitz, M. Weber, R. Weeratna et al. // *Oligonucleotides.* – 2010. – Vol. 20, N 2. – P. 93 – 101.

91. A novel non-mineral oil-based adjuvant. I. Efficacy of a synthetic sulfolipoplysaccharide in a squalane-in-water emulsion in laboratory animals / L.A. Hilgers, P.L. Platenburg, A. Luitjens et al. // *Vaccine.* – 1994. – Vol. 12, N 7. – P. 653–660.

92. A recombinant live attenuated strain of *Vibrio cholerae* induces immunity against tetanus toxin and *Bordetella pertussis* tracheal colonization factor / I. Chen, T.M. Finn, L. Yanqing et al. // *Infect. Immun.* – 1998. – Vol. 66, N 4. – P. 1648–1653.
93. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA / H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai et al. // *Nature.* – 2000. – Vol. 408, N 6813. – P. 740–745.
94. Abdulhaqq, S.A. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses / S. A. Abdulhaqq, D. Weiner // *Immunol. Res.* – 2008. – Vol. 42, N 1. – P. 219–232.
95. Ada, G. Overview of vaccines and vaccination / G. Ada // *Mol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 29, N 3. – P. 255–272.
96. Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle / S.A. Romera, L.A. Hilgers, M. Puntel et al. // *Vaccine.* – 2000. – Vol. 19, N 1. – P. 132–141.
97. Adjuvant properties of lipopolysaccharide from *Neisseria meningitidis* serogroup B detoxified and conjugated with tetanus toxoid / J.A. Balboa, M. Cuello, O. Cabrera et al. // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24, Suppl. 2. – P. 63–64.
98. Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on toll-like receptor agonists / M. Black, A. Trent, M. Tirrell et al. // *Expert Rev. Vaccines.* – 2010. – Vol. 9, N 2. – P. 157–173.
99. Advax-adjuvanted recombinant protective antigen provides protection against inhalational anthrax that is further enhanced by addition of murabutide adjuvant / B. Feinen, N. Petrovsky, A. Verma et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2014. – Vol. 21, N 4. – P. 580–586.
100. Alginate coated chitosan microparticles mediated oral delivery of diphtheria toxoid. Part A. Systematic optimization, development and characterization / A. Shukla, V. Mishra, B.S. Bhoop et al. // *Int. J. Pharm.* – 2015. – Vol. 495, N 1. – P. 220–233.
101. Allosteric mechanism controls traffic in the chaperone/usher pathway / X.D. Yu, A. Dubnovitsky, A.F. Pudney et al. // *Structure.* – 2012. – Vol. 20, N 11. – P. 1861–71.

102. An encapsulated *Yersinia pseudotuberculosis* is a highly efficient vaccine against pneumonic plague / A. Debeise, A. Cerda Marin, P. Ave et al. // PLoS. Negl. Trop. Dis. – 2012. – Vol. 6, N 2. – P. 1528–1539.
103. Analysis of gene-environment interactions in postnatal development of the mammalian intestine / S. Rakoff-Nahoum, Y. Kong, S.H. Kleinstein et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2015. – Vol. 112, N 7. – P. 1929–1936.
104. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski et al. // Anal. Biochem. – 1982. – Vol. 126, N 1. – P. 131–138.
105. Analysis of the *Yersinia pestis* V protein for the presence of linear antibody epitopes / J.K. Pullen, G.W., Jr. Anderson, S.L. Welkos et al. // Infect. Immun. – 1998. – Vol. 66, N 2. – P. 521–527.
106. Anti-idiotypic antibody as a potential candidate vaccine for *Neisseria meningitidis* serogroup B / I.H. Park, J.H. Youn, I.H. Choi, et al. // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73, N 10. – P. 6399–6406.
107. Antibodies as a source of anti-infective peptides: an update / W. Magliani, L. Giovati, T. Ciociola et al. // Future Microbiol. – 2015. – Vol. 10, N 7. – P. 1163–1175.
108. Antibody responses to *Yersinia pestis* F1-antigen expressed in *Salmonella typhimurium* aroA from *in vivo*-inducible promoters / H.L. Bullifent, K.F. Griffin, S.M. Jones, et al. // Vaccine. – 2000. – Vol. 18, N 24. – P. 2668–2676.
109. Antigen-free adjuvant assists late effector CD4 T cells to transit to memory in lymphopenic hosts / F.B. Guloglu, J.S. Ellis, X. Wan et al. // J. Immunol. – 2013. – Vol. 191, N 3. – P. 1126–1135.
110. Arakawa, T. Adjuvants: no longer a 'dirty little secret', but essential key players in vaccines of the future / T. Arakawa // Expert Rev. Vaccines. – 2011. – Vol. 10, N 1. – P. 1–5.
111. Arnon, R. Old and new vaccine approaches / R. Arnon, T. Ben-Yedidia // Int. Immunopharmacol. – 2003. – Vol. 3, N 8. – P. 1195–1204.

112. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity / A.M. Didierlaurent, S. Morel, L. Lockman et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, N 10. – P. 6186–6197.

113. B cells can modulate the CD8 memory T cell after DNA vaccination against experimental tuberculosis / L.P. Almeida, A.P. Trombone, J.C. Lorenzi et al. // *Genet. Vaccines Ther.* – 2011. – Vol. 9. – P. 5–9.

114. Bachmann, M.F. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns / M.F. Bachmann, G.T. Jennings // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 10, N 11. – P. 787–796.

115. Bacterial ghosts as adjuvant particles / E.M. Riedmann, J.M. Kyd, A.W. Cripps et al. // *Expert Rev. Vaccines.* – 2007. – Vol. 6, N 2. – P. 241–253.

116. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles / U.B. Mayr, P. Walcher, C. Azimpour et al. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2005. – Vol. 57, N 9. – P. 1381–1391.

117. Baillie, L. Past, imminent and future human medical countermeasures for anthrax / L. Baillie // *J. Appl. Microbiol.* – 2006. – Vol. 101, N 3. – P. 594–606.

118. Barouch, D.H. Expression kinetics of the interleukin-2/immunoglobulin (IL-2/Ig) plasmid cytokine adjuvant / D.H. Barouch, D.M. Truitt, N.L. Letvin // *Vaccine.* – 2004. – Vol. 22, N 23–24. – P. 3092–3097.

119. Barr, T.A. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants / T.A. Barr, J. Carling, A.W. Heath // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24, N 17. – P.3399–3407.

120. Basu, S. Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses / S. Basu, P.K. Srivastava // *Cell Stress Chaperones.* – 2000. – Vol. 5, N 5. – P. 443–451.

121. Beauclair, K.D. Protection of mice against *Brucella abortus* by immunization with polyclonal anti-idiotypic antibodies / K.D. Beauclair, D.N. Khansari // *Immunobiology.* – 1990. – Vol. 180, N 2–3. – P. 208–220.

122. Becker, P.D. Genetic immunization: bacteria as DNA vaccine delivery vehicles / P.D. Becker, M. Noerder, C.A. Guzman // *Hum. Vaccin.* – 2008. – Vol. 4, N 3. – P. 189–202.

123. Behn, U. Idiotypic networks: toward a renaissance? / U. Behn // *Immunol Rev.* – 2007. – N 216. – P. 142–52.
124. Benacerraf, B. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region-specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes / B. Benacerraf // *J. Immunol.* – 1978. – Vol. 120, N 6. – P. 1809–1812.
125. Bergquist, C. AnticARRIER immunity suppresses the antibody response to polysaccharide antigens after intranasal immunization with the polysaccharide-protein conjugate / C. Bergquist, T. Lagergard, J. Holmgren // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65, N 5. – P. 1579–1583.
126. Bhatla, S.C. Use of oil bodies and oleosins in recombinant protein production and other biotechnological applications / S.C. Bhatla, V. Kaushik, M.K. Yadav // *Biotechnol. Adv.* – 2010. – Vol. 28, N 3. – P. 293–300.
127. Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases / C. Lin, S. Lin, Y. Yang, et al. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2015. – Vol. 11, N 3. – P. 650–656.
128. Biogenesis of the fraction 1 capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis* / L.M. Runco, S. Myrczek, J.B. Bliska et al. // *J. Bacteriol.* – 2008. – Vol. 190, N 9. – P. 3381–3385.
129. Biosynthetically engineered lipopolysaccharide as vaccine adjuvant // A. Zariri, P. van der Ley Expert // *Rev. Vaccines.* – 2015. – Vol. 14, N 6. – P. 861–876.
130. Blum, J.S. Pathways of antigen processing / J.S. Blum, P.A. Wearsch, P. Cresswell // *Ann. Rev. Immunol.* – 2013. – N 31. – P 443–473.
131. Bona, C.A. Towards development of T-cell vaccines / C.A. Bona, S. Casares, T.D. Brumeanu // *Immunol. Today.* – 1998. – Vol. 19, N 3. – P. 126–133.
132. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72, N. 1–2. – P. 248–254.
133. Bramwell, V.W. Particulate delivery systems for vaccines: what can we expect? / V.W. Bramwell, Y. Perrie // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 58, N 6. – P. 717–728.

134. Brunner, R. The ABC of clinical and experimental adjuvants a brief overview / R. Brunner, E. Jensen-Jarolim, I. Pali-Scholl // Immunol. Lett. – 2010. – Vol. 128, N 1. – P. 29–35.

135. Burdin, N. Immunological foundations to the quest for new vaccine adjuvants / N. Burdin, B. Guy, P. Moingeon // BioDrugs. – 2004. – Vol. 18, N 2. – P. 79–93.

136. Burnette, W.N. Bacterial ADP-ribosylating toxins: form, function, and recombinant vaccine development / W.N. Burnette // Behring. Inst. Mitt. – 1997. –N 98. – P. 434–441.

137. Casella, C. Putting endotoxin to work for us: Monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant / C. Casella, T. Mitchell // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – Vol. 65, N 20. – P. 3231–3240.

138. Cationic liposomes extend the immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotide against *Burkholderia pseudomallei* infection in BALB/c mice / A. Puangpetch, R. Anderson, Y.Y. Huang et al. // Clin. Vaccine Immunol. – 2012. – Vol. 19, N 5. – P. 675–683.

139. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. / J. Vitoriano-Souza, N. das D. Moreira, A. Teixeira-Carvalho et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, N 7. – P. 40745.

140. Chemical synthesis and proinflammatory responses of monophosphoryl lipid A adjuvant candidates / K.K. Maiti, M. Decastro, A.B. El-Sayed et al. // European J. Org. Chem. – 2010. – Vol. 2010, N 1. P. 80–91.

141. Chitosan as an adjuvant for a *Helicobacter pylori* therapeutic vaccine / Y. Gong, L. Tao, F. Wang et al. // Mol. Med. Rep. – 2015. – Vol. 12, N 3. – P. 4123–4132.

142. Cholera toxin adjuvant promotes a balanced Th1/Th2/Th17 response independently of IL-12 and IL-17 by acting of Gs α in CD11b⁺ DCs / J. Mattsson, K. Schon, L. Ekman et al. // Mucosal Immunol. – 2015. – Vol. 8, N 4. – P. 815–827.

143. Christian, D.A. Particle-mediated delivery of cytokines for immunotherapy / D.A. Christian, C.A. Hunter // Immunotherapy. – 2012. – Vol. 4, N 4. – P. 425–441.

144. Coffman, R.L. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work / R.L. Coffman, A. Sher, R.A. Seder // *Immunity*. – 2010. – Vol. 33, N 4. – P. 492–503.
145. Coincorporation of LpxL1 and PagL mutant lipopolysaccharides into liposomes with *Neisseria meningitidis* opacity protein: influence on endotoxic and adjuvant activity / J. Arenas, H. van Dijken, B. Kuipers et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2010. – Vol. 17, N 4. – P. 487–495.
146. Comparative tests for detection of plague antigen and antibody in experimentally infected wild rodents / A.J. Shepherd, D.E. Hummitzsch, P.A. Leman et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1986. – Vol. 24, N 6. – P. 1075–1078.
147. Comparison of passive haemagglutination and enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of plague / J.E. Williams, L. Arntzen, D.M. Robinson et al. // *Bull. WHO.* – 1982. – Vol. 60, N 5. – P. 777–781.
148. Conjugation of lipid and CpG-containing oligonucleotide yields an efficient method for liposome incorporation / C.D. Andrews, C.J. Provoda, G. Ott et al. // *Bioconjug. Chem.* – 2011. – Vol. 22, N 7. – P. 1279–1286.
149. CpG oligodeoxynucleotides adsorbed onto polylactide-co-glycolide microparticles improve the immunogenicity and protective activity of the licensed anthrax vaccine / H. Xie, I. Gursel, B.E. Ivins // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73, N 2. – P. 828–833.
150. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants / S.C. Eisenbarth, O.R. Colegio, W. O'Connor et al. // *Nature*. – 2008. – Vol. 453, N 7198. – P. 1122–1126.
151. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3 / H. Li, S.B. Willingham, J.P. Ting et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181, N 1. – P. 17–21.
152. Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV / J.J. Kim, K.A. Simbiri, J.I. Sin et al. // *J. Interferon Cytokine Res.* – 1999. – Vol. 19. – P. 77–84.
153. Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvants / S. Pasquini, Z. Xiang, Y. Wang et al. // *Immunol. Cell Biol.* – 1997. – Vol. 75, N 4. – P. 397–401.

154. Cytokines as natural adjuvants for vaccines: where are we now? / P. Rizza, M. Ferrantini, I. Capone et al. // Trends Immunol. – 2002. – Vol. 23, N 8. – P. 381–383.
155. Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines / D.J. Chen, N. Osterrieder, S.M. Metzger et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2010. – Vol. 107, N 7. – P. 3099–3104.
156. Delivery of immunostimulatory RNA oligonucleotides by gelatin nanoparticles triggers an efficient antitumoral response / C. Bourquin, C. Wurzenberger, S. Heidegger, et al. // J. Immunother. – 2010. – Vol. 33, N 9. – P. 935–944.
157. Designing improved poly lactic-co-glycolic acid microspheres for a malarial vaccine: incorporation of alginate and polyinosinic-polycytidilic acid. / A. Salvador, M. Igartua, R.M. Hernández et al. // J. Microencapsul. – 2014. – Vol. 31, N 6. – P. 560–566.
158. Development of an Acid-Resistant *Salmonella* Typhi Ty21a Attenuated Vector For Improved Oral Vaccine Delivery / M.N. Dharmasena, C.M. Feuille, C.E.C. Starke et al. // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, N 9. – e0163511.
159. Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines / S.A. Audouy, S. van Selm, M.L. van Roosmalen et al. // Vaccine. – 2007. – Vol. 25, N 13. – P. 2497–2506.
160. Development of *Yersinia pestis* F1 antigen-loaded microspheres vaccine against plague / S. Huang, I.-H. Li, P. Hong et al. // Int. J. Nanomedicine. – 2014. – Vol. 9. – 813–822.
161. Development of *Yersinia pestis* F1 antigen-loaded microspheres vaccine against plague / S. Huang, I.H. Li, P. Hong et al. // Int. J. Nanomedicine. – 2014. – N 9. – P. 813–822.
162. Diphtheria toxoid-containing microparticulate powder formulations for pulmonary vaccination: preparation, characterization and evaluation in guinea pigs / M. Amidi, H.C. Pellikaan, H. Hirschberg et al. // Vaccine. – 2007. – Vol. 25, N 37–38. – P. 6818–6829.
163. DNA mediated vaccines delivery through nanoparticles / M.A. Shah, Z. Ali, R. Ahmad et al. // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2015. – Vol. 15, N 1. – P. 41–53.

164. Du, Z. Pathology and pathogenesis of *Yersinia pestis* / Z. Du, X. Wang // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – Vol. 918. – P. 193–222.
165. Dwivedy, A. Importance of innate mucosal immunity and the promises it holds / A. Dwivedy, P. Aich // Int. J. Gen. Med. – 2011. – Vol. 4. – P. 299–311.
166. Ebensen, T. Immune modulators with defined molecular targets: cornerstone to optimize rational vaccine design / T. Ebensen, C.A. Guzman // Hum. Vaccin. – 2008. – Vol. 4, N 1. – P. 13–22.
167. Effect of dimerization of the D-glucose analogue of muramyl dipeptide on stimulation of macrophage-like cells / J. Murata, T. Kitamoto, Y. Ohya et al. // Carbohydr. Res. – 1997. – Vol. 297, N 2. – P. 127–133.
168. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes / K. Zaks, M. Jordan, A. Guth et al. // J. Immunol. – 2006. – Vol. 176, N 12. – P. 7335–7345.
169. Ellis, T.N. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles / T.N. Ellis, M.J. Kuehn // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2010. – Vol. 74, N 1. – P. 81–94.
170. Encapsulation into amphiphilic polyanhydride microparticles stabilizes *Yersinia pestis* antigens / B. Carrillo-Conde, E. Schiltz, J. Yu et al. // Acta Biomater. – 2010. – Vol. 6, N 8. – P. 3110–3119.
171. Evaluation of *Brucella abortus* DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2 / A. González-Smith, R. Vemulapalli, E. Andrews et al. // Immunobiology. – 2006. – Vol. 211, N 1–2. – P. 65–74.
172. Expression and functional validation of heat-labile enterotoxin B (LTB) and cholera toxin B (CTB) subunits in transgenic rice (*Oryza sativa*) / H.S. Soh, H.Y. Chung, H.H. Lee et al. // SpringerPlus. – 2015. – Vol. 4. – 148.
173. Expression and refolding of the protective antigen of *Bacillus anthracis*: A model for high-throughput screening of antigenic recombinant protein refolding / M.E. Pavan, E.E. Pavan, F.M. Cairó et al. // Rev. Argent. Microbiol. – 2016. – Vol. 48, N 1. – P. 5–14.

174. Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of an *aroA* mutant of *Salmonella typhimurium* induces high levels of protection against plague / R.W. Titball, A.M. Howells, P.C.F. Oyston et al. // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65, N 5. – P. 1926–1930.
175. Fairbanks, G. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane / G. Fairbanks, T.L. Steck, D.F.H. Wallach // *Biochemistry.* – 1971. – Vol. 10, N 13. – P. 2606–2617.
176. Fedorova, V.A. Assessment of live plaque vaccine candidates / V.A. Fedorova, L.V. Sayapina, V.L. Motin // *Methods Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 1403. – P. 487–498.
177. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates / S.B. Mizel, A.H. Graff, N. Sriranganathan et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2009. – Vol. 16, N 1. – P. 21–28.
178. Fox, C.B. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery / C.B. Fox // *Molecules.* – 2009. – Vol. 14, N 9. – P. 3286–3312.
179. Freytag, L.C. Mucosal adjuvants / L.C. Freytag, J.D. Clements // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23, N 15. – P. 1804–1813.
180. Galen, J.E. The delicate balance in genetically engineering live vaccines / J.E. Galen, R. Curtiss 3rd // *Vaccine.* – 2014. – Vol. 32, N 35. P. – 4376–4385.
181. Gat, O. *In vitro* screen of bioinformatically selected *Bacillus anthracis* vaccine candidates by coupled transcription, translation, and immunoprecipitation analysis / O. Gat, H. Grosfeld, A. Shafferman // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 375. – P. 211–233.
182. Gregoriadis, G. The immunological adjuvant and vaccine carrier properties of liposomes / G. Gregoriadis // *J. Drug Targeting.* – 1994. – Vol. 2, N 5. – P. 351–356.
183. Gupta, R.K. Biodegradable polymer microspheres as vaccine adjuvants and delivery systems / R.K. Gupta, A.C. Chang, G.R. Siber // *Dev. Biol. Stand.* – 1998. – Vol. 92. – P. 63–78.

184. Gupta, G. Cell-mediated immune response and Th1/Th2 cytokine profile of B-T constructs of F1 and V antigen of *Yersinia pestis* / G. Gupta, A.A. Khan, D.N. Rao // *Scand. J. Immunol.* – 2010. – Vol. 71, N 3. – P. 186–198.
185. Gurkan, C. Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* / C. Gurkan, D.J. Ellar // *Microb. Cell Fact.* – 2005. – Vol. 4. – P. 33.
186. Gursel, M. The immunological co-adjuvant action of liposomal interleukin-2: the role of mode of localisation of the cytokine and antigen in the vesicles / M. Gursel, G. Gregoriadis // *J. Drug. Target.* – 1998. – Vol. 5, N 2. – P. 93–98.
187. Hadzija, O. A simple method for the quantitative determination of muramic acid / O. Hadzija // *Anal. Biochem.* – 1974. – Vol. 60, N 2. – P. 512–517.
188. Hanes, J. Degradation of porous poly(anhydride-co-imide) microspheres and implications for controlled macromolecule delivery / J. Hanes, M. Chiba, R. Langer // *Biomaterials.* – 1998. – Vol. 19, N 1–3. – P. 163–172.
189. Harandi, A.M. Vaccine adjuvants: scientific challenges and strategic initiatives / A.M. Harandi, G. Davies, O.F. Olesen // *Expert Rev. Vaccines.* – 2009. – Vol. 8, N 3. – P. 293–298.
190. Harlow, E. Antibodies: a laboratory manual / E. Harlow D. Lane // Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. – 1988. – 726 p.
191. Heat Shock Proteins: stimulators of innate and acquired immunity / C.A. Colaco, C.R. Bailey, K.B. Walker et al. // *BioMed Research International.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 461230.
192. Heat-shock proteins as dendritic cell-targeting vaccines – getting warmer / S. McNulty, C.A. Colaco, L.E. Blandford, et al. // *Immunology* – 2013. – Vol. 139, N 4. – P. 407–415.
193. Hefferon, K. Clinical trials fuel the promise of plant-derived vaccines / K. Hefferon // *Am. J. Clin. Med.* – 2010. – Vol. 7, N 1. – P. 30–37.
194. Higgins, S.C. TLR, NLR agonists, and other immune modulators as infectious disease vaccine adjuvants / S.C. Higgins, K.H.G. Mills // *Curr. Infect. Dis. Rep.* – 2010. – Vol. 12, N 1. – P. 4–12.

195. Hilgers, L.A. Sucrose fatty acid sulphate esters as novel vaccine adjuvant / L.A. Hilgers, A.G. Blom // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24, Suppl. 2. – P. 81–82.
196. Hirsch J.G. Studies of bactericidal action of phagocytes / J.G. Hirsch // *J. Exp. Med.* – 1956. – Vol. 103. – P. 613–615.
197. Humoral immune responses and protective efficacy of sequential B- and T-cell epitopes of V antigen of *Yersinia pestis* by intranasal immunization in microparticles / J.B. Uppada, A.A. Khan, E.A. Bhat et al. // *Med. Microbiol. Immunol.* – 2009. – Vol. 198, N 4. – P. 247–256.
198. IL-17 contributes to cell-mediated defense against pulmonary *Yersinia pestis* infection / J.S. Lin, L.W. Kummer, F.M. Szaba et al. // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 186, N 3. – P. 1675–1684.
199. Immune modulation of recombinant OmpA against *Brucella abortus* 544 infection in mice / H.L. Simborio, A.W. Reyes, H.T. Hop et al. // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 26, N 3. – P. 603–609.
200. Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant / S. Adams, D.W. O'Neill, D. Nonaka et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181, N 1. – P. 776–784.
201. Immunogenicity and efficacy of anthrax/plaque DNA fusion vaccine in a mouse model / M.T. Albrecht, J.E. Eyles, L.W. Baillie et al. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2012. – Vol. 65, N 3. – P. 505–509.
202. Immunogenicity and efficacy of oral or intranasal *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei* proteosome-lipopolysaccharide vaccines in animal models / N. Orr, G. Robin, D. Cohen et al. // *Infect. Immun.* – 1993. – Vol. 61, N 6. – P. 2390–2395.
203. Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response / C. Bourquin, L. Schmidt, V. Hornung, et al. // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, N 7. – P. 2953–2960.
204. Impact of cross-linking and drying method on drug delivery performance of casein-pectin microparticles / R.N. Marreto, M.F. Ramos, E.J. Silva et al. // *AAPS Pharm.Sci.Tech.* – 2013. – Vol. 14, N 3. – P. 1227–1235.

205. Impact of formulation and particle size on stability and immunogenicity of oil-in-water emulsion adjuvants / V. Iyer, C. Cayatte, B. Guzman et al. // *Hum. Vaccin. Immunothera.* – 2015. – Vol. 11, N 7. – P. 1853–1864.
206. Induction of an epitope-specific humoral immune response by lipopeptide-hapten conjugates: enhancement of the anti-melittin response by a synthetic T helper (Th)-cell epitope / P. Hoffmann, M. Loleit, K. Mittenbuhler et al. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1997. – Vol. 17, N 4. – P. 225–234.
207. Induction of protective and mucosal immunity against diphtheria by a immune stimulating complex (ISCOMS) based vaccine / A. Aguila, A.M. Donachie, M. Peyre et al. // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24, N 24. – P. 5201–5210.
208. Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy / S.L. Demento, S.C. Eisenbarth, H.G. Foellmer et al. // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27, N 23. – P. 3013–3021.
209. Influenza virus-like particles containing M2 induce broadly cross protective immunity / J.M. Song, B.Z. Wang, K.M. Park et al. // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6, N 1. – e14538.
210. Intradermal vaccination with influenza virus-like particles by using microneedles induces protection superior to that with intramuscular immunization / F.S. Quan, Y.C. Kim, A. Vunnava et al. // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84, N 15. – P. 7760–7769.
211. Intranasal delivery of influenza subunit vaccine formulated with GEM particles as an adjuvant / V. Saluja, J. P. Amorij, M. van Roosmalen et al. // *AAPS. J.* – 2010. – Vol. 12, N 2. – P. 109–116.
212. Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection / A.J. Hickey, J. Lin, L.W. Kummer et al. // *Infect Immun.* – 2013. – Vol. 81, N 6. – P. 2123–2132.
213. Irvine, D.J. Engineering synthetic vaccines using cues from natural immunity / D.J. Irvine, M.A. Swartz, G.L. Szeto // *Nat. Mater.* – 2013. – Vol. 12, N 11. – P. 978–990.
214. Ishii, K. Toll or Toll-free adjuvant path toward the optimal vaccine development / K. Ishii, S. Akira // *J. Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 27, N 4. – P. 363–371.

215. Iwasaki, A. Control of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // *Nat. Immunol.* – 2015. – Vol. 16, N 4. – P. 343–353.
216. Kaplow, L.S. A histochemical procedure for locating and evaluation leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and bone marrow / L.S. Kaplow // *Blood.* – 1955. – Vol. 10, N 2. – P. 1023–1029.
217. Kawai, T. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition / T. Kawai, S. Akira // *Int. Immunol.* – 2009. – Vol. 21, N 4. – P. 317–337.
218. Khan, K.H. DNA vaccines: roles against diseases. / K.H. Khan // – 2013. – Vol. 3, N 1. – P. 26–35.
219. Kiyono, H. The mucosal immune system: From dentistry to vaccine development / H. Kiyono, T. Azegami // *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences.* – 2015. – Vol. 91, N 8. – P. 423–439.
220. Kudela, P. Bacterial ghosts (BGs) – advanced antigen and drug delivery system / P. Kudela, V.J. Koller, W. Lubitz // *Vaccine.* – 2010. – Vol. 28, N 36. – P. 5760–5767.
221. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, N 17. – P. 680–685.
222. Laemmli, U.K. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events / U.K. Laemmli, M. Favre // *J. Mol. Biol.* – 1973. – Vol. 80. – P. 575–599.
223. Lai, Z. Outer membrane protein complex of Meningococcus enhances the antipolysaccharide antibody response to pneumococcal polysaccharide-CRM conjugate vaccine / Z. Lai, J.R. Schreiber // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2011. – Vol. 18, N 5. – P. 724–729.
224. Lee, M.Y. Transcutaneous antigen delivery system / M.Y. Lee, M.C. Shin, V.C. Yang // *BMB Rep.* – 2013. – Vol. 46, N 1. – P. 17–24.
225. Li, L. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity / L. Li, N. Petrovsky // *Expert Rev. Vaccines.* – 2016. – Vol.15, N 3. – P. 313–329.
226. Li, L. The future of human DNA vaccines / L. Li, F. Saade, N. Petrovsky // *J. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 162, N 2–3. – P. 171–182.

227. Lipid A mimetics are potent adjuvants for an intranasal pneumonic plague vaccine / C.L. Airhart, H.N. Rohde, C.J. Hovde et al. // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, N 44. – P. 5554–5561.

228. Liposomal adjuvants for human vaccines / C.R. Alving, Z. Beck, G.R. Matyas et al. // *Expert Opin. Drug. Deliv.* – 2016. – Vol. 13, N 6. – P. – 807–816.

229. Liposome-Based Adjuvants for Subunit Vaccines: Formulation Strategies for Subunit Antigens and Immunostimulators / S. Tandrup Schmidt, C. Foged, K. Smith Korsholm et al. // *Pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 8, N 1. – P. 7–29.

230. Liposomes act as stronger sub-unit vaccine adjuvants when compared to microspheres / D.J. Kirby, I. Rosenkrands, E.M. Agger et al. // *J. Drug Target*. – 2008. – Vol. 16, N 7. – P. 543–554.

231. Liu, Y. Enhancement of adaptive immunity to *Neisseria gonorrhoeae* by local intravaginal administration of microencapsulated interleukin 12 / Y. Liu, N.K. Egilmez, M.W. Russell // *J. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 208, N 11. – P. 1821–1829.

232. Live-attenuated *Yersinia pestis* vaccines / X. Wang, X. Zhang, D. Zhou et al. // *Expert Rev. Vaccines*. – 2013. – Vol. 12, N 6. – P. 677–686.

233. Lovgren, B.K. ISCOM technology–based Matrix M adjuvant: success in future vaccines relies on formulation / B.K. Lovgren, B. Morein, A.D. Osterhaus // *Expert Rev. Vaccines*. – 2011. – Vol. 10, N 4. – P. 401–403.

234. Lubitz, P. Applications of bacterial ghosts in biomedicine / P. Lubitz, U.B. Mayr, W. Lubitz // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2009. – Vol. 655. – P. 159–170.

235. Martínez-Chavarría, L.C. *Yersinia pestis*–host immune cells interactions at early events during bubonic plague infection / L.C. Martínez-Chavarría // *Curr. Trop. Med. Rep.* – 2016. – Vol. 3, N 2. – P. 51–59.

236. Mason, H.S. Recombinant immune complexes as versatile and potent vaccines / H.S. Mason // *Hum. Vaccin. Immunother.* – 2016. – Vol. 12, N 4. – P. 988–989.

237. McKinney, M.M. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid / M.M. McKinney, A. Parkinson // *J. Immunol. Meth.* – 1987. – Vol. 96, N 2. – P. 271–278.

238. Methods for delivering DNA to intracellular receptors / K.J. Stacey, A. Idris, V. Sagulenko // *Methods Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 1390. – P. 93–106.

239. Mohan, T. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead / T. Mohan, P. Verma, D.N. Rao // *Indian J. Med. Res.* – 2013. – Vol. 138, N 5. – P. 779–795.

240. Molecular assembly of botulinum neurotoxin progenitor complexes / D.A. Benefield, S.K. Dessain, N. Shine et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2013. – Vol. 110, N 14. – P. 5630–5635.

241. Moser, C. Influenza virosomes as a vaccine adjuvant and carrier system / C. Moser, M. Amacker, R. Zurbriggen // *Expert Rev. Vaccines.* – 2011 – Vol. 10, N 4. – P. 437–446.

242. Moyle, P.M. Self-adjuvanting lipopeptide vaccines / P.M. Moyle, I. Toth // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15, N 5. – P. 506–516.

243. New Strategies Toward Edible Vaccines: An Overview / A. Aryamvally, V. Gunasekaran, K.R. Narenthiran, et al. // *J. Diet. Suppl.* – 2017. – Vol. 14, N 1. – P. 101–116.

244. On the benefits of sin: can greater understanding of the 1F7-idiotypic repertoire freeze enhance HIV vaccine development? / M.S. Parsons, S. Muller, H. Kohler et al. // *Hum. Vaccin. Immunother.* – 2013. – Vol. 9, N 7. – P. 1532–1538.

245. Optimization, production, and characterization of a CpG-oligonucleotide-Ficoll conjugate nanoparticle adjuvant for enhanced immunogenicity of anthrax protective antigen / B. Milley, R. Kiwan, G.S. Ott et al. // *Bioconjug. Chem.* – 2016. — Vol. 27, N 5. – P. 1293–1304.

246. Ouchterlony, O. Antigen-antibody reaction in gels / O. Ouchterlony // *Acta Pathol. Microbiol. Immunol.* – 1949. – Vol. 26, N 4. – P. 507–515.

247. Park, B.H. Infection and nitro-blue tetrazolium reduction by neutrophils: a diagnostic aid / B.H. Park, S.M. Firkig, E.M. Smithwick // *Lancet.* – 1968. – Vol. 2, N 7567. – P. 532–534.

248. Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable / G.L. Peterson // *Anal. Biochem.* – 1977. – Vol. 83, N 2. – P. 346–356.

249. Pha, K. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses / K. Pha, L. Navarro // *World J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 7, N 1. – P. 1–13.

250. Poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene] is a potent adjuvant for intradermal immunization / A.K. Andrianov, D.P. DeCollibus, H.A. Gillis et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2009. – Vol. 106, N 45. – P. 18936–18941.

251. Progress in *Brucella* vaccine development / X. Yang, J.A. Skyberg, L. Cao, et al. // *Front Biol.* – 2013. – Vol. 8, N 1. – P. 60–77.

252. Progress on plague vaccine development / J.A. Rosenzweig, O. Jejelowo, J. Sha et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 91, N 2. – P. 265–286.

253. Protection against pneumonic plague following oral immunization with a non-replicating vaccine / A. Jones, C. Bosio, A. Duffy et al. // *Vaccine.* – 2010. – Vol. 28, N 36. – P. 5924–5929.

254. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr et al. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275.

255. Quenee, L.E. Plague vaccines and the molecular basis of immunity against *Yersinia pestis* / L.E. Quenee, O. Schneewind // *Hum. Vaccine.* – 2009. – Vol. 5, N 12. – P. 817–823.

256. Rapid detection of *Yersinia pestis* recombinant fraction 1 capsular antigen / P.Y. Tsui, H.P. Tsai, D.J. Chiao et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 99, N 18. – P. 7781–7789.

257. Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines / F. Azmi, A. Al Hadi A. Fuaad et al. // *Hum. Vaccin. Immunother.* – 2014. – Vol. 10, N 3. – P. 778–796.

258. Recognition of CpG oligodeoxynucleotides by human Toll-like receptor 9 and subsequent cytokine induction / S. Suwanti, T. Yamazaki, S. Chechetka et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol. 430, N 4. – P. 1234–1239.

259. Recombinant (F1+V) vaccine protects cynomolgus macaques against pneumonic plague / E.D. Williamson, P.J. Packer, E.L. Waters et al. // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 24, 29. – P. 29–30.
260. Russian vaccines against especially dangerous bacterial pathogens / V.A. Feodorova, L.V. Sayapina, M.J. Corbel et al. // *Emer. Microbes Infect.* – 2014. – Vol. 3, N 12. – P. 86–98.
261. Sanchez, J. Cholera toxin – a foe & a friend / J. Sanchez, J. Holmgren // *Indian J. Med. Res.* – 2011. – Vol. 133, N 2. – P. 153–163.
262. Schwendener, R.A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances / R.A. Schwendener // *Ther. Adv. Vaccines*. – 2014. – Vol. 2, N6. – P. 159–182.
263. Self-adjuvanting polyacrylic nanoparticulate delivery system for group A streptococcus (GAS) vaccine / M. Zaman, M. Skwarczynski, J.M. Malcolm et al. // *Nanomedicine*. – 2011. – Vol. 7, N 2. – P. 168–173.
264. Shahid, N. Plant-based oral vaccines against zoonotic and non-zoonotic diseases / N. Shahid, H. Daniell // *Plant Biotechnol. J.* – 2016. – Vol. 14, N 11. – P. 2079–2099.
265. Single-shot immunization with recombinant adenovirus encoding vaccinia virus glycoprotein A27L is protective against a virulent respiratory poxvirus infection / R. Rudraraju, A.J. Ramsay // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 28, N 31. – P. 4997–5004.
266. Smiley, S.T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague / S.T. Smiley // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2008. – Vol. 7, N 2. – P. 209–221.
267. Structural basis for Myf and Psa fimbriae-mediated tropism of pathogenic strains of *Yersinia* for host tissues / N. Pakharukova, S. Roy, M. Tuittila et al. // *Mol. Microbiol.* – 2016. – Vol. 102, N 4. – P. 593–610.
268. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation / A.V. Zavialov, J Berglund, A.F. Pudney et al. // *Cell*. – 2003. – Vol. 113, N 5. – P. 587–596.

269. Studies on immunization against plague. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis* / E.E. Baker, H. Sommer, L.E. Foster et al. // J. Immunol. – 1952 – Vol. 68, N 2. – P. 131–45.

270. Subunit vaccines: distearoylphosphatidylcholine-based liposomes entrapping antigen offer a neutral alternative to dimethyldioctadecylammonium-based cationic liposomes as an adjuvant delivery system / S.E. McNeil, I. Rosenkrands, E.M. Agger et al. // J. Pharm. Sci. – 2011. – Vol. 100, N 5. – P. 1856–1865.

271. Sun, W. Rational considerations about development of live attenuated *Yersinia pestis* vaccines / W. Sun, R. Curtiss // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2013 – Vol. 14, N 10. – P. 878–886.

272. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts / C.C. Willhite, N.A. Karyakina, R.A. Yokel et al. // Crit Rev Toxicol. – 2014. – Vol. 44, Suppl. 4. – P. 1–80.

273. T cells play an essential role in anti-F1 mediated rapid protection against bubonic plague / Y. Levy, Y. Flashner, A. Tidhar et al. // Vaccine – 2011. – Vol. 29, N 40. – P. 6866–6873.

274. Tennant, S.M. Live attenuated vaccines for invasive *Salmonella* infections / S.M. Tennant, M.M. Levine // Vaccine. – 2015 – Vol. 33, Suppl 3. – P. 36–41.

275. Testa, J.S. Role of T-cell epitope-based vaccine in prophylactic and therapeutic applications / J.S. Testa, R. Philip // Future Virol. – 2012. – Vol. 7, N 11. – P. 1077–1088.

276. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4⁺ T cells / B.S. Thompson, P.M. Chilton, J.R. Ward et al. // J. Leukoc. Biol. – 2005. – Vol. 78, N 6. – P. 1273–1280.

277. The *Yersinia pestis* *cafIM1A1* fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague / F. Sebbane, C. Jarrett, D. Gardner et al. // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77, N 3. – P. 1222–1229.

278. Timing of Toll-Like receptor 9 agonist administration in pneumococcal vaccination impacts both humoral and cellular immune responses as well as nasopha-

ryngeal colonization in mice / K. M. Jensen, J. Melchjorsen, F. Dagnaes-Hansen et al. // *Infect. Immun.* – 2012. – Vol. 80, N 5. – P. 1744–1752.

279. Toward self-adjuvanting subunit vaccines: model peptide and protein antigens incorporating covalently bound toll-like receptor-7 agonistic imidazoquinolines / N.M. Shukla, T.C. Lewis, T.P. Day et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – Vol. 21, N 11. – P. 3232–3236.

280. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Stachelin, J. Gordon // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – Vol. 76, N 9. – P. 4350–4354.

281. Transgenic plants: a 5-year update on oral antipathogen vaccine development / M. Hernandez, G. Rosas, J. Cervantes et al. // *Expert Rev. Vaccines.* – 2014. – Vol. 13, N 12. – P. 1523–1536.

282. Tsai, C.M. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels / C.M. Tsai, C.E. Frasch // *Anal. Biochem.* – 1982. – Vol. 119, N 1. – P. 115–119.

283. Uddowla, S. Effect of adjuvants and route of immunizations on the immune response to recombinant plague antigens / S. Uddowla, L.C. Freytag, J.D. Clements // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25, N 47. – P. 7984–7993.

284. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants / C. Maisonneuve, S. Bertholet, D.J. Philpott et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2014. – Vol. 111, N 34. – P. 12294–12299.

285. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond / A. Di Pasquale, S. Preiss, F.T. Da Silva, N. Garcon // *Vaccines.* – 2015. – Vol. 3, N 2. – P. 320–343.

286. Vaccines, new opportunities for a new society / R. Rappuoli, M. Pizza, G. Del Giudice et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2014 – Vol. 111, N 34. – P. 12288–12293.

287. Verma, S.K. A recombinant trivalent fusion protein F1-LcrV-HSP70(II) augments humoral and cellular immune responses and imparts full protection against *Yersinia pestis* / S.K. Verma, L. Batra, U. Tuteja // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 1053–1063.

288. Verma, S.K. Plague vaccine development: current research and future trends / S.K. Verma, U. Tuteja // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 7. – Article 602.
289. Vollmer, J. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists / J. Vollmer, A.M. Krieg // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2009. – Vol. 61, N 3. – P. 195–204.
290. Wahren, B. DNA Vaccines: Recent developments and the future / B. Wahren, M.A. Liu // *Vaccines.* – 2014. – Vol. 2, N 4. – P. 785–796.
291. Wu, L. A method for purification of bacterial R–type lipopolysaccharides (lipooligosaccharides) / L. Wu, C. Tsai, C.E. Frasch // *Anal. Biochem.* – 1987. – Vol. 160, N 2. – P. 281–289.
292. *Yersinia pestis* Caf1 protein: effect of sequence polymorphism on intrinsic disorder propensity, serological cross-reactivity and cross-protectivity of isoforms / P.K. Kopylov, M.E. Platonov, V.G. Ablamunits et al. // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11, N 9. – P. 1–16.
293. *Yersinia pestis*: retrospective and perspective / editors R. Yang, A. Anisimov. // 2016. – 391 p.
294. Zachova, K. Antigen cross-presentation and heat shock protein-based vaccines / K. Zachova, M. Krupka, M. Raska // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2016. – Vol. 64, N 1. – P. 1–18.
295. Zaman, Z. Quantitation of proteins solubilized in sodium dodecyl sulphate-mercaptoethanol-tris electrophoresis buffer / Z. Zaman, R.L. Verwilghem // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 100, N 1. – P. 64–69.
296. Zhao, Y. Lipid nanoparticles for gene delivery / Y. Zhao, L. Huang // *Adv. Genet.* – 2014. – N 88. – P. 13–36.
297. Zhu, D. QS-21: a potent vaccine adjuvant / D. Zhu, W. Tuo // *Nat. Prod. Chem. Res.* – 2016. – Vol. 3, N 4. – P. 113–115.
298. Zhu, M. Applications of nanomaterials as vaccine adjuvants / M. Zhu, R. Wang, G. Nie // *Hum. Vaccin. Immunother.* – 2014. – Vol. 10, N 9. – P. 2761–2774.