

УДК 616-097:57.083.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ ЧУМНОГО МИКРОБА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЫРАЖЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Половинкина В.С., Войткова В.В., Николаев В.Б., Дубровина В.И., Марков Е.Ю.

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

*Поиск оптимальных методов, позволяющих оценить клеточный иммунитет, для определения качества иммунопрофилактики чумы является одним из перспективных направлений исследований. Цель работы заключается в определении корреляционных связей между популяциями лейкоцитов у мышей, иммунизированных экспериментальными антигенными препаратами *Yersinia pestis*. В качестве параметра для определения напряженности иммунитета использовали показатели содержания лейкоцитов и их субпопуляций, а также Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD3^+ CD4^+$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+ CD8^+$) в крови мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами (комплекс на основе клеточных оболочек (КО), фракция 1 (F1) и тотальной ДНК (тДНК) *Y. pestis*). В процессе исследования были выявлены множественные корреляционные связи между популяциями лейкоцитов у мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами, что указывает на перспективность применения проточной цитометрии для оценки иммунного статуса организма при вакцинальном процессе.*

Ключевые слова: клеточный иммунитет, клеточные оболочки (КО), фракция 1 (F1), тотальная ДНК, *Yersinia pestis*

Для цитирования: Половинкина В.С., Войткова В.В., Николаев В.Б., Дубровина В.И., Марков Е.Ю. Исследование диагностической значимости субклеточных фракций чумного микроба для оценки выраженности иммунного ответа. Медицина труда и экология человека. 2019; 4:34-38.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10045>

RESEARCH OF DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF SUBSTLATE FACILITIES OF A PLAGUE MICROBE FOR EVALUATION OF EXPRESSION OF IMMUNE RESPONSE
Polovinkina V.S., Voitkova V.V., Nikolaev V.B., Dubrovina V.I., Markov E.Yu.

Russian Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russian Federation

*The search for optimal methods for assessing cellular immunity to determine the quality of plague immunoprophylaxis is one of the promising areas of research. The aim of the work is to determine the correlation between leukocyte populations in mice immunized with experimental antigens *Yersinia pestis*. As a parameter for determining immunity, we used indicators of the content of leukocytes and their subpopulations, as well as T-lymphocytes ($CD3^+$), T-helpers ($CD3^+CD4^+$), cytotoxic T-lymphocytes ($CD3^+CD8^+$) in the blood of mice immunized with experimental drugs (complex based on cell envelopes, fraction 1, total DNA of*

Y. pestis). The study revealed multiple correlation between leukocyte populations in mice immunized with experimental drugs, which indicates the promise of using flow cytometry to assess the body's immune status in the vaccination process.

Key words: cellular immunity, cell envelopes, fraction 1 (F1), total DNA, *Yersinia pestis*.

For citation: Polovinkina V.S., Voitkova V.V., Nikolaev V.B., Dubrovina V.I., Markov E.Yu. Investigation of the diagnostic significance of the subcellular fractions of the plague microbe to assess the severity of the immune response. *Occupational Occupational health and human ecology*. 2019; 4:34-38

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10045>

Введение

Чума – особо опасное инфекционное заболевание, которое до сих пор продолжает оставаться серьезной угрозой для здоровья населения, как в природных очагах, так и при выносе возбудителя за пределы энзоотичной территории, что обуславливает необходимость разработки надежных средств профилактики и лечения [1, 2].

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. В связи с чем перспективным направлением создания эффективных вакцин может быть использование препаратов, несущих так называемые патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMPs), целенаправленно воздействующие на врожденный иммунитет организма через систему специфических рецепторов (PRRs) [3, 4, 5, 6].

Поиск оптимальных методов, позволяющих оценить клеточный иммунитет, для определения качества иммунопрофилактики, разработка тестов *in vitro* для оценки эффективности вакцинных препаратов и иммуномодуляторов являются одними из перспективных направлений исследований.

Цель работы – исследовать корреляционные связи между популяциями и субпопуляциями лейкоцитов у мышей, иммунизированных экспериментальными антигенными препаратами.

Материалы и методы

В работе использовали антигенный комплекс *Y. pestis* на основе клеточных оболочек (КО), фракции 1 (F1) и тотальной ДНК (тДНК) *Y. pestis* [7, 8]. Для определения напряженности иммунитета оценивали показатели содержания лейкоцитов и их субпопуляций (моноцитов, общее содержание гранулоцитов, нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов), а также Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺ CD4⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺ CD8⁺) в крови мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами. Подопытным животным (150 сертифицированных

(НПО «Вектор», Новосибирск) беспородных белых мышей) подкожно вводили следующие препараты (в 0,2 мл физиологического раствора): группа 1 – F1 + КО (12,5 мкг), группа 2 – F1 + КО (12,5 мкг) + тДНК (10 мкг) *Y. pestis*. Контролем служили белые мыши, получившие физиологический раствор в объеме 0,2 мл. Учет результатов проводился на 3, 7, 14 и 21 сутки. Белых мышей выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (2016) и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях (Страсбург, 1986).

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов установлено статистически значимое повышение как абсолютного, так и относительного содержания нейтрофильных гранулоцитов у экспериментальных животных первой и второй групп. Стоит также отметить, что наиболее выраженные изменения содержания этих клеток имеют место у мышей, иммунизированных препаратом F1 + КО.

Анализ динамики субпопуляционного состава лимфоцитов крови мышей, иммунизированных F1 + КО + тДНК показал увеличение относительного числа Т-лимфоцитов на 3, 7 и 21 сутки, а также существенное перераспределение Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. В случае применения тДНК имело место увеличение показателей относительного содержания CD8⁺-лимфоцитов во все сроки наблюдения, а также увеличение относительного содержания Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) на 7 и 21 сутки ($P < 0,01$). Показано увеличение относительных значений клеток-предшественников кортикальных тимоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) во всех экспериментальных группах на 3, 7 и 14 сутки, а в случае второй группы на 21-е сутки – в среднем в два раза по сравнению с контролем (0,26 (0,16–0,33); $P < 0,05$). В случае сочетанного применения F1 + КО с тДНК показано статистически значимое ($P < 0,01$) увеличение содержания CD3⁺CD4⁻CD8⁻-клеток на 3 и 14 сутки.

У экспериментальных животных, получивших F1 + КО, а также F1 + КО в сочетании с тДНК, корреляционный анализ показал взаимосвязь количества лейкоцитов с моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и лимфоцитами, Т-лимфоцитами, Т-хелперами, CD3⁺CD4⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁻CD8⁻.

Анализ взаимосвязей между субпопуляциями лимфоцитов выявил прямые корреляционные связи относительных показателей Т-лимфоцитов с CD3⁺CD4⁺-клетками у мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами.

Для оценки степени активации Т-лимфоцитов и моноцитов нами был проведен анализ экспрессии высокоаффинного рецептора IL-2 (CD25), отражающего способность клеток к пролиферации и дифференцировке. Как показали исследования, у мышей всех экспериментальных групп наблюдалось увеличение численности активированных Т-лимфоцитов, в частности Т-хелперов на 3, 14 и 21 сутки ($P < 0,05$). Анализ экспрессии CD25 моноцитами и макрофагами крови показал, что сочетанное применение препарата F1 + КО с тДНК приводит к снижению их содержания в ранние сроки наблюдения (3 сутки) по сравнению с контролем ($P < 0,01$). В группе экспериментальных животных,

иммунизированных препаратом F1 + КО в сочетании с тДНК, установлено наличие дополнительных корреляций содержания моноцитов, экспрессирующих CD25, с нейтрофилами. Также у мышей второй группы выявлены корреляционные связи нейтрофилов с CD3⁺CD4⁺CD25⁺ и CD3⁺CD25⁺, а у мышей третьей группы – с CD3⁺CD8⁺CD25⁺, в то время как у мышей, получивших F1 + КО, подобные корреляции отсутствуют [9].

Заключение

Таким образом, комплексный препарат вакцинного штамма чумного микроба на основе КО и F1-антигена, а также его сочетанное применение с тДНК повышают пролиферацию предшественников тканевых макрофагов и гранулоцитов. Увеличение содержания Т-хелперов, экспрессирующих CD25, при иммунизации мышей экспериментальными препаратами указывает на повышение пролиферативной активности этих клеток. Выявленные в процессе исследования множественные корреляционные связи между популяциями лейкоцитов у мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами, указывают на перспективность применения проточной цитометрии для оценки иммунного статуса организма при вакцинальном процессе.

Список литературы:

1. Бугоркова С.А., Девдариани З.Л., Щуковская Т.Н., Кутырев В.В. Исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2013; 3: 63–69.
2. Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Олефир Ю.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. Проблемы особо опасных инфекций. 2016; 2: 107–110.
3. Семакова А.П., Микшис Н.И. Адъювантные технологии в создании современных вакцин. Проблемы особо опасных инфекций. 2016; 2: 28–35.
4. Smiley S.T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague. Expert. Rev. Vaccines. 2008; 7(2): 209–221.
5. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends. Front. Immunol. 2016; 7: – Article 602.
6. Yang R., Anisimov A., editors. Yersinia pestis: retrospective and perspective. Dordrecht: Springer; 2016; 391.
7. Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Капсульный антиген чумного микроба. Инфекция и иммунитет. 2015; 5 (3): 201–218.
8. Николаев В.Б., Иванова Т.А., Половинкина В.С., Саппо С.Г., Попова Ю.О., Марков Е.Ю., Голубинский Е.П., авторы; Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, патентообладатель. Способ получения иммуногенного препарата из Yersinia pestis EV. Патент на изобретение RU 2248217. 22.05.2003.

9. Guloglu F.B., Ellis J.S., Wan X., Dhakal M., Hoeman C.M., Cascio J.A., et al. Antigen-free adjuvant assists late effector CD4 T cells to transit to memory in lymphopenic hosts. *J. Immunol.* 2013; 191(3): 1126–35.

References:

1. Bugorkova S.A., Devdariani Z. L., Schukovskaya T.N., Kuttyrev V.V. Historical and modern ideas about the problem of specific prevention of plague. *Problems of particularly dangerous infections.* 2013; 3: 63–69.
2. Sayapina, L.V., Bondarev V.P., Olefir Yu.V. The current state of vaccination for especially dangerous infections. *Problems of particularly dangerous infections.* 2016; 2: 107–110.
3. Semakova, A.P., Mikshis N.I. Adjuvant technology in the development of modern vaccines. *Problems of particularly dangerous infections.* 2016; 2: 28–35.
4. Smiley, S.T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague. *Expert. Rev. Vaccines.* 2008; 7 (2): 209–221.
5. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends. *Front Immunol.* 2016; 7: - Article 602.
6. Yang R., Anisimov A., editors. *Yersinia pestis: retrospective and perspective.* Dordrecht: Springer; 2016; 391.
7. Kadnikova L.A., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Capsular antigen of the plague microbe. *Infection and immunity.* 2015; 5 (3): 201–18.
8. Nikolaev VB, Ivanova T.A., Polovinkina V.S., Sappo S.G., Popova Yu.O., Markov E.Yu., Golubinsky EP, inventors; Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and the Far East, assignee. A method of obtaining an immunogenic preparation from *Yersinia pestis* EV. Patent for invention RUS 2248217. 05/22/2003.
9. Guloglu F.B., Ellis J.S., Wan X., Dhakal M., Hoeman C.M., Cascio J.A., et al. Antigen-free adjuvant assists late effector CD4 T cells to transit to memory in lymphopenic hosts. *J. Immunol.* 2013; 191 (3): 1126–35.

Поступила/Received: 25.10.2019

Принята в печать/Accepted: 28.10.2019