

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ЛЕТАЛЬНОГО ТОКСИНА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* И ЕГО ВЛИЯНИЯ НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОКИНОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Цыбульский А.В.¹, Тимченко Н.Ф.², Костецкий Э.Я.¹, Воробьева Н.С.¹

¹ Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Владивосток, Россия

Резюме. Представлены данные, характеризующие антигенные и иммуногенные свойства термостабильного летального токсина *Yersinia pseudotuberculosis* — белка с молекулярной массой 45 кДа. Показана более высокая антителопродукция у мышей, иммунизированных токсином дважды в дозе 0,1 мкг/мышь в сравнении с дозой 0,01 мкг. Выявлены различия в лейкоцитарной реакции: развитие лейкопении, нейтро- и лимфопении при иммунизации дозой токсина 0,01 мкг и лейкоцитоза (а также прироста содержания лимфоцитов и моноцитов) при дозе 0,1 мкг белка. Установлены различия в цитокин-модулирующей активности разных доз токсина: при дозе в 0,01 мкг/мышь развивались преимущественно реакции, имеющие провоспалительную острофазовую направленность, тогда как доза 0,1 мкг/мышь вызывала к 17-м суткам эксперимента индукцию IFN γ и цитокинов, способствующих пролиферации лимфоцитов и активации антителопродуцентов. Токсин проявлял протективные свойства при двукратной иммунизации мышей и последующем их заражении летальной дозой *Y. pseudotuberculosis*. Замедленная активация антителопродуцентов при реакции организма мышей на ТСТ свидетельствует об актуальности поиска эффективных адъювантных средств усиления и ускорения развития специфической гуморальной иммунной реакции на этот антиген.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, термостабильный токсин, иммуногенность, протективность, цитокины

Адрес для переписки:

Цыбульский Александр Васильевич
к.м.н., доцент кафедры биохимии,
микробиологии и биотехнологии Школы
естественных наук Дальневосточного
федерального университета
690000, Россия, г. Владивосток,
ул. Октябрьская, 27.
Тел.: 8 (914) 968-62-98.
E-mail: avt_biotech@mail.ru

Авторы:

Цыбульский А.В. — к.м.н., доцент кафедры биохимии,
микробиологии и биотехнологии Школы естественных
наук Дальневосточного федерального университета,
г. Владивосток, Россия

Тимченко Н.Ф. — д.м.н., профессор, заведующая
лабораторией молекулярных основ патогенности
бактерий ФГБУ «Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова»
Сибирского отделения Российской академии медицинских
наук, г. Владивосток, Россия

Костецкий Э.Я. — д.б.н., профессор, заведующий кафедрой
биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы
естественных наук Дальневосточного федерального
университета, г. Владивосток, Россия

Воробьева Н.С. — аспирант кафедры биохимии,
микробиологии и биотехнологии Школы естественных
наук Дальневосточного федерального университета,
г. Владивосток, Россия

Поступила 30.07.2013

Принята к печати 21.08.2013

A STUDY OF IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF THE HEAT-STABLE LETHAL TOXIN OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* AND ITS EFFECTS UPON HEMATOLOGICAL AND BLOOD CYTOKINE PARAMETERS OF LABORATORY MICE

Tsybulsky A.V.^a, Timchenko N.F.^b, Kostetsky E.Ya.^a,
Vorobieva N.S.^a

^a Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^b G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. The article presents some data concerning antigenic and immunogenic properties of the lethal heat-stable toxin (HST) from *Yersinia pseudotuberculosis*, a protein with molecular weight of 45 kDa. The mice, following double immunization with HST at a dose of 0.1 mg per mouse, displayed higher antibody production, in comparison with a dose of 0.01 mg/mouse. The appropriate differences were revealed with regard of leukocyte responses, i.e., development of leukopenia, neutropenia, lymphopenia upon immunization with the 0.01 mg of HST per mouse, whereas leukocytosis, and increase in lymphocytes and monocytes was detected after a dose of 0.1 mg/mouse. We detected some dose-dependent differences in cytokine-modulating activity. I.e., at HST dose of 0.01 mg per mouse, we detected mostly proinflammatory, acute-phase responses, whereas a dose of 0.1 mg/mice caused induction of $\text{IFN}\gamma$ and cytokines promoting lymphocyte proliferation and antibody production by day +17. Upon double immunization of mice, the toxin showed protective properties when injecting them with lethal dose of *Y. pseudotuberculosis*. A lagging activation of antibody producers during HST response suggests a need for searching effective adjuvant tools of enhancement and acceleration of specific humoral immune reactions against this antigen. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 3, pp 227-236)

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, heat-stable toxin, immunogenicity, protective effect, cytokines

Address for correspondence:

Tsybulsky Alexander V.
PhD, Associate Professor, Department of Biochemistry,
Microbiology and Biotechnology, Far Eastern Federal
University
690000, Russian Federation, Vladivostok,
Oktyabrskaya str., 27.
Phone: 7 (914) 968-62-98.
E-mail: avt_biotech@mail.ru

Authors:

Tsybulsky A.V., PhD (Medicine), Associate Professor,
Department of Biochemistry, Microbiology and
Biotechnology, Far Eastern Federal University,
Vladivostok, Russian Federation

Timchenko N.F., PhD, MD (Medicine), Professor,
Head, Laboratory of Molecular Basis of Pathogenicity
of Bacteria, G.P. Somov Research Institute of
Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of
Russian Academy of Medical Sciences, Vladivostok,
Russian Federation

Kostetsky E.Ya., PhD, MD (Biology), Professor,
Head, Department of Biochemistry, Microbiology
and Biotechnology, Far Eastern Federal University,
Vladivostok, Russian Federation

Vorobieva N.S., Postgraduate Student, Department
of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology,
Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian
Federation

Received 30.07.2013

Accepted 21.08.2013

Введение

В настоящее время псевдотуберкулез определяют как острое инфекционное заболевание, характеризующееся полиморфизмом клинических проявлений, поражением желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата, печени и других органов, общей интоксикацией, экзантемой, часто рецидивирующим и затяжным течением [8]. Известно, что в этих процессах задействованы многие биомолекулы возбудителя, факторы патогенности *Yersinia pseudotuberculosis*, в частности токсины [5, 6, 7, 10, 12, 13, 14].

Одним из токсинов *Y. pseudotuberculosis* является термостабильный летальный токсин (ТСТ), белок с молекулярной массой 45 кДа, способный продуцироваться большинством из всех изученных штаммов *Y. pseudotuberculosis* как при низкой (6–8 °С), так и при высокой (37 °С) температуре культивирования [10]. В отличие от большинства других бактериальных токсинов, ТСТ не теряет активности при прогревании (56 °С) и способен без потери активности выдерживать кипячение до 5 мин. С действием этого токсина связывают развитие типичных для псевдотуберкулеза полиорганных дистрофически-деструктивных изменений, мембранолитическое действие на клетки паренхиматозных органов [3], а также характерное для этой инфекции иммуносупрессивное действие, затрагивающее как факторы неспецифической резистентности (в частности фагоцитоз), так и механизмы адаптивного специфического иммунитета [1, 2, 4, 12].

Механизмы действия бактериальных токсинов интенсивно изучаются в настоящее время. В частности, установлено их влияние на состояние клеточных мембран, активность ряда ферментов и окислительно-восстановительные параметры (модуляция активности глутатион-редуктазы, супероксиддисмутазы, АДФ-фосфорибозилтрансферазы и др.), пролиферативную активность клеток [7, 9].

В экспериментах на мышах показана способность ТСТ ингибировать синтез белка, усиливать перекисное окисление липидов, повышать количество цАМФ в эукариотических клетках, модулировать редокс-потенциал полиморфноядерных и мононуклеарных лейкоцитов, супрессировать гуморальный и Т-клеточный механизмы специфического иммунного ответа [2, 3, 4, 10].

Таким образом, ТСТ является важным фактором патогенности *Y. pseudotuberculosis*, наряду с другими токсинами (суперантигеном YpM, поробразующими белками, термолабильным токсином и др.). Этот токсин также имеет белковую структуру, большую молекулярную массу (45 кДа)

и способен выступать в роли специфического антигена с полиэпитопной характеристикой, вызывая развитие специфического иммунного ответа. Однако до сих пор не получены надежные доказательства наличия свойств протективности у антигенов ТСТ. В связи с этим в настоящее время нет достаточных оснований для использования этого антигена в качестве компонента вакцинных препаратов.

Псевдотуберкулезная инфекция не является в настоящее время глобальной эпидемической угрозой для человечества. Тем не менее, имеется определенный интерес к разработке средств специфической профилактики этой инфекции, который обусловлен повсеместным распространением возбудителя, способностью *Y. pseudotuberculosis* адаптироваться к неблагоприятным условиям среды обитания, а также известной концепцией о клональном происхождении *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis* [9]. Вакцинопрофилактика псевдотуберкулеза, к тому же, является интересной моделью для разрешения вопросов, связанных с трудностями эффективной вакцинации в отношении целого ряда актуальных для здоровья человека инфекционных заболеваний.

Решение подобных вопросов повышения эффективности вакцинации предполагает несколько направлений исследований. Применительно к иерсиниозам это следующие подходы. Во-первых, поиск иммуногенных молекул — структурных компонентов возбудителя и его токсинов, способных индуцировать развитие протективного иммунного ответа. Во-вторых, детальное изучение механизмов иммуносупрессии, вызываемой антигенами иерсиний, и применение технологии нейтрализации этой активности (получение анатоксинов). В-третьих, использование адъювантных носителей для таких антигенов, способных повышать величину специфического иммунного ответа. Применение активно изучаемых в настоящее время липидсапониновых контейнеров-адъювантов может позволить направленно изменять конформацию бактериальных антигенов с целью повышения их иммуногенности и нейтрализации иммуносупрессорной активности токсинов. Это является предметом нашего научного интереса и будет изучено в дальнейшем.

Целью настоящей работы является изучение биологических свойств ТСТ *Y. pseudotuberculosis* как потенциально перспективного белкового антигена для построения в дальнейшем на его основе вакцинных конструкций. Изучены иммуногенность ТСТ, его влияние на гематологические и цитокиновые параметры, а также проведена оценка свойств этого белка как протективного

антигена при экспериментальной псевдотуберкулезной летальной инфекции у мышей.

Материалы и методы

ТСТ получали по методу, описанному в работе [9]. Использовали штамм 512, серовар I *Y. pseudotuberculosis*, изолированный из фекалий больного.

Биологические испытания токсина проводили на лабораторных животных — неинбредных мышах (самцах) массой 20-22 г и инбредных мышах линии СВА массой 18-20 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария НИИЭМ СО РАМН в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Оценку иммуногенных свойств ТСТ и его влияния на гематологические параметры и цитокиновые показатели проводили на лабораторных инбредных мышах линии СВА массой 18-20 г. Применяли различные схемы иммунизации ТСТ в дозах от 0,001 до 1 мкг белка на мышь. Препарат вводили внутримышечно (в/м) в объеме 10 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Схемы иммунизации: однократная с получением сыворотки и цельной крови для анализа через сроки 7 и 21 день после иммунизации и двукратная (с недельным интервалом и получением биологического материала через 21 день от даты первой иммунизации).

Иммуноферментный анализ. Уровень антителообразования в сыворотках крови определяли твердофазным неконкурентным иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием антимишинных IgG, меченных пероксидазой, как описано ранее [11]. В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин производства BD (США). Уровень специфических антител определяли с использованием планшетного спектрофотометра Elx808-iu (BioTek, США) при длине волны 450 нм.

Определение цитокинов проводили методом ИФА с использованием наборов BD ELISA Set Mouse для интерлейкинов IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, а также для интерферона гамма (IFN γ) и гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в соответствии с указаниями в приложенных к наборам инструкциях. Определяли относительное содержание цитокинов в каждой экспериментальной группе, выраженное в единицах оптической плотности при длине волны 450 нм.

Гематологические показатели оценивали в цельной периферической крови мы-

шей, собранной в вакутейнеры с напылением в качестве антикоагулянта натриевой соли ЭДТА. Анализ проб цельной крови проводили на гематологическом анализаторе CELL-DYN 3700 (Abbott Laboratories, США) с использованием ветеринарного программного модуля для анализа клеток крови мышей.

Вирулентность LD₅₀ культур *Y. pseudotuberculosis* определяли при внутрибрюшинном (в/бр) заражении неинбредных мышей весом 20 г. Гибель животных регистрировали в течение 30 дней. LD₅₀ рассчитывали по Керберу.

Протективную активность ТСТ определяли при использованной схеме иммунизации и заражения (0+10+10+20). Токсин использовали в дозах 0,02 и 0,1 мкг/мышь, маршрут введения в/м. Мышей линии СВА иммунизировали дважды с 10-дневным интервалом, затем еще через 10 дней производили (в/бр) заражение 10LD₅₀ *Y. pseudotuberculosis*. Срок наблюдения после даты заражения составил 20 суток. Рассчитывали процент выживших животных и среднюю длительность жизни (относительно срока наблюдения).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладной программы SPSS 11/0 с определением критерия достоверности Фишера—Стьюдента. Различия между двумя средними считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

При оценке эффективности различных схем иммунизации мышей ТСТ мы остановились в итоге на использовании дозы в 0,1 мкг белка на мышь и одно- или двукратной иммунизации с 7- или 10-дневным интервалом. Поскольку параметры специфического гуморального иммунного ответа на ТСТ оказались однотипными при в/бр и в/м способах введения, выбор был сделан в пользу более щадящего в/м маршрута. Дозы ТСТ в 0,01 мкг/мышь и ниже обеспечивали незначительный статистически недостоверный прирост содержания специфических анти-ТСТ антител в сравнении с интактными животными, тогда как доза ТСТ в 0,1 мкг/мышь приводила к статистически достоверному ($p < 0,05$) приросту содержания специфических антител (рис. 1).

Отметим, что данная тенденция, характеризующая дозозависимость гуморального иммунного ответа на ТСТ, оказалась одинаковой у беспородных белых мышей и мышей линии СВА. Учитывая то, что LD₅₀ для ТСТ составляет 4,5 мкг/мышь, дальнейшее повышение дозы токсина является потенциально опасным, и последующие эксперименты проводились именно с дозой не выше 0,1 мкг ТСТ на мышь. Данная доза ТСТ существенно меньше летальной и нали-

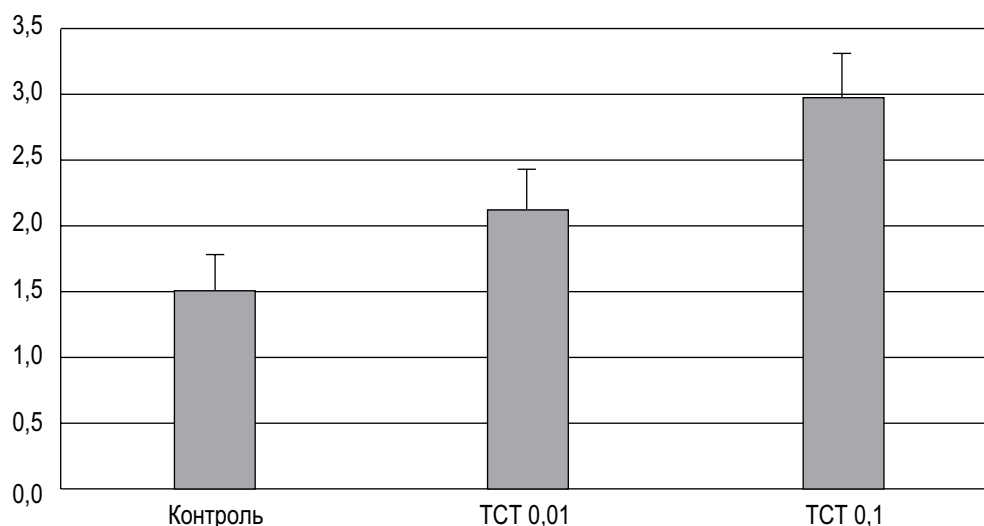


Рисунок 1. Относительные показатели содержания антител против ТСТ в сыворотке крови мышей линии СВА после двукратной (с 7-дневным интервалом) в/м иммунизации ТСТ (через 21 сутки после первой иммунизации)

Примечание. По оси абсцисс: контроль – сыворотка крови неиммунизированных мышей, ТСТ 0,01 и ТСТ 0,1 – сыворотка крови мышей, иммунизированных ТСТ, соответственно, в дозах 0,01 и 0,1 мкг/мышь. По оси ординат – оптическая плотность проб при 450 нм.

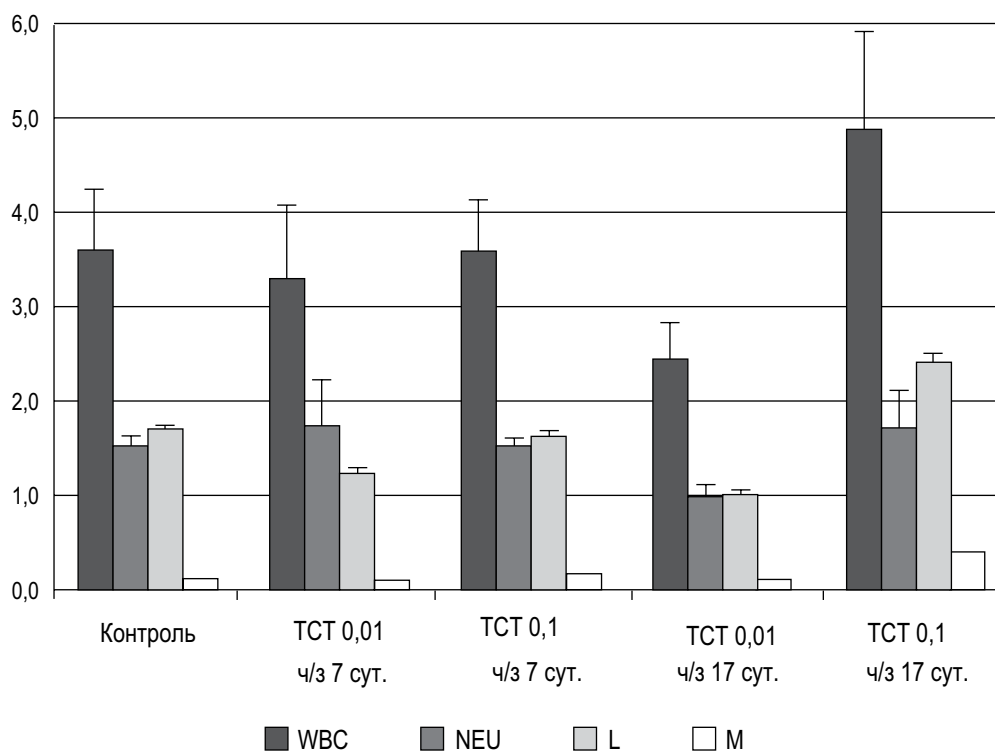


Рисунок 2. Содержание лейкоцитов и их популяций – нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов в крови мышей, иммунизированных ТСТ в дозах 0,01 и 0,1 мкг/мышь: через 7 суток после первой иммунизации и через 10 суток после второй иммунизации

Примечание. WBC – лейкоциты, Neu – нейтрофилы, L – лимфоциты, M – моноциты периферической крови ($\times 10^9/\text{л}$).

чие выраженного ответа со стороны гуморальных механизмов иммунного ответа на данный токсин позволяет высказать мнение о целесообразности продолжения исследований с этим белком как перспективным антигеном для построения на его основе вакцинных конструкций.

Учитывая тот факт, что многие факторы патогенности микроорганизмов проявляют гематотоксические свойства, что, в частности, ведет к известному эффекту транзиторной лейкопении и другим изменениям формулы крови, мы провели исследования гематологических параме-

тров в соответствующем по схеме эксперименте (т.е. при двукратной иммунизации мышей линии СВА токсином в дозах 0,01 и 0,1 мкг на мышь и оценке параметров крови через 7 суток после первой иммунизации и через 10 суток после второй). Результаты, представленные на рисунке 2, показывают, что введение ТСТ в организм мышей приводит к заметным изменениям в гематологических параметрах.

Обращает на себя внимание развитие лимфопении ($p < 0,05$ в сравнении с контролем) на 7 сутки после введения ТСТ мышам в дозе 0,01 мкг/мышь и лейкопении и нейтропении на 17 сутки эксперимента при сохранении в эти сроки пониженного содержания лимфоцитов. Интересно, что введение более высокой дозы ТСТ – 0,1 мкг/мышь не приводит к таким изменениям. На 17 сутки эксперимента в этой группе отмечается заметная (хотя и статистически недостоверная) тенденция к развитию лейкоцитоза, а также прирост содержания в крови лимфоцитов и моноцитов ($p < 0,05$). Можно высказать предположение, что такие междозовые различия являются, скорее, не следствием разницы в прямой иммуноотоксичности, а результатом различий в иммунорегуляторных механизмах, запускаемых данным бактериальным токсином при попадании в организм животных. Отметим, что другие гематологические параметры, обычно снимаемые при работе автоматических гематологических анализаторов с цельной кровью, заметных

различий не продемонстрировали (данные не показаны). Таким образом, модулирующее (активирующее) действие токсина в дозе 0,1 мкг/мышь затрагивает преимущественно мононуклеарные популяции лейкоцитов при поддержании на физиологическом уровне (уровне интактного контроля) показателей гранулоцитов.

Были проведены исследования содержания в сыворотке крови мышей восьми цитокинов, обладающих как про-, так и противовоспалительными, иммунорегуляторными и эффекторными свойствами. Результаты, представленные на рисунке 3, показывают, что введение ТСТ в организм мышей приводит к заметным изменениям цитокиновых параметров.

Имеются различия в цитокиновых параметрах у иммунизированных животных в сравнении с контролем, а также между группами животных, получивших разные дозы ТСТ. В первые 7 дней после однократной иммунизации ТСТ дозами 0,01 и 0,1 мкг/мышь выявлена заметная тенденция к подавлению активности IL-1, важного для инициирования начальных этапов иммунного ответа, на фоне повышения активности IL-6 (фактора дифференцировки В-лимфоцитов и дублера многих функций IL-1 в плане регуляции острофазовых воспалительных процессов). При этом к 17-м суткам эксперимента (т.е. через 10 суток после второй иммунизации) возникают различия между группами по этим параметрам. Происходит резкая активация IL-1 и снижение

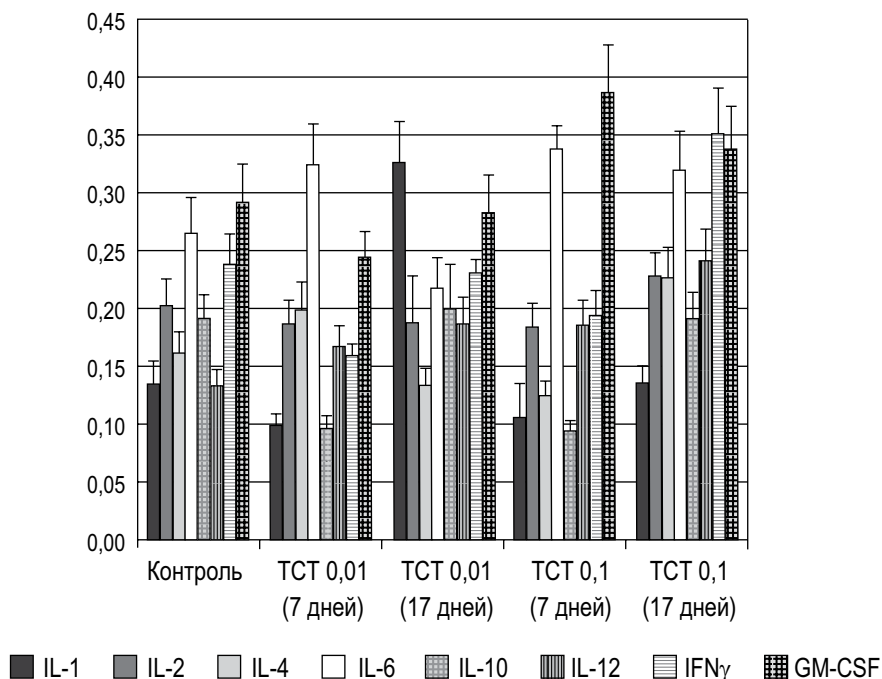


Рисунок 3. Содержание цитокинов в сыворотке крови мышей линии СВА через 7 и 17 дней после в/м иммунизации ТСТ в дозах 0,01 и 0,1 мкг/мышь

Примечание. По оси ординат – оптическая плотность проб при длине волны 450 нм.

уровня ИЛ-6 в группе мышей, иммунизированных токсином в меньшей дозе, тогда как у животных, иммунизированных ТСТ в дозе 0,1 мкг/мышь, сохраняется относительно низкий уровень ИЛ-1 и повышенный уровень ИЛ-6. В целом эти данные демонстрируют сохраняющийся достаточно долгое время после введения в организм провоспалительный эффект ТСТ. Отсутствие стимулирующего действия токсина в дозе 0,1 мкг/мышь на ИЛ-1, возможно, связано с иммуносупрессивным действием ТСТ на макрофагальное звено, т.е. на клетки, являющиеся основным продуцентом ИЛ-1 и в значительной мере – ИЛ-6. Другие клетки – продуценты ИЛ-6 – видимо, затрагиваются токсическим действием в меньшей степени, что можно предположить на основании сохранения высокого уровня продукции ИЛ-6 животными, иммунизированными ТСТ в дозе 0,1 мкг/мышь. В этой группе обнаружена также и более высокая активность $IFN\gamma$ – цитокина, продуцируемого Т-лимфоцитами и имеющего, наряду с провоспалительными свойствами, большой спектр иммунорегуляторной активности. При иммунизации токсином в дозе 0,1 мкг/мышь на 17-е сутки эксперимента определяется и более высокая концентрация ИЛ-12 ($p < 0,05$) в сравнении с контролем и всеми другими экспериментальными группами. Данный провоспалительный цитокин стимулирует пролиферацию Т-хелперов, индуци-

рующих механизмы клеточно-опосредованного иммунитета, а также активирует НК-лимфоциты. Отметим также повышенный уровень активности ИЛ-2, ИЛ-4 и GM-CSF в сыворотке крови мышей, иммунизированных дважды дозой токсина в расчете 0,1 мкг/мышь, тогда как в первые 7 суток после однократной иммунизации выявлено снижение уровня активности фактора роста В-лимфоцитов – ИЛ-4 (более выраженное при применении дозы ТСТ в 0,1 мкг/мышь, $p < 0,05$).

Таким образом, можно предположить, что развитие специфического гуморального иммунного ответа против ТСТ развивается со значительным временным лагом, а на ранних сроках ответа на этот бактериальный антиген индуцируется супрессорное действие токсина против макрофагального звена и развиваются клеточно-опосредованные реакции воспаления. Данные анализа цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-12, $IFN\gamma$ и GM-CSF хорошо коррелируют с вышеприведенными данными, характеризующими более выраженную реакцию специфических антителопродуцентов, а также с показателями, характеризующими развитие лейкоцитоза и увеличение содержания лимфоцитов в группе животных, иммунизированных более высокой дозой ТСТ.

В завершение данной работы была поставлена задача оценить протективные свойства ТСТ в условиях экспериментального в/бр заражения мы-

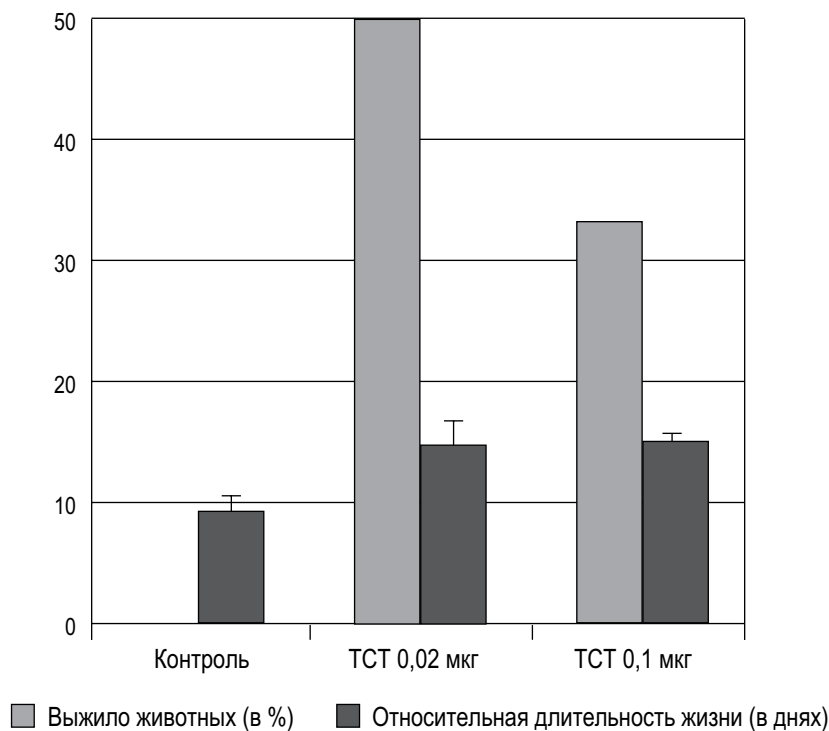


Рисунок 4. Показатели выживаемости и относительной длительной жизни мышей, иммунизированных ТСТ в/м в дозах 0,02 и 0,1 мкг/мышь и зараженных в/бр летальной дозой *Y. pseudotuberculosis*

Примечание. По оси ординат – процент выживших мышей и средняя длительность жизни животных экспериментальных групп в днях (относительно 20-дневного срока наблюдения после заражения).

шей летальной дозой *Y. pseudotuberculosis*. После двукратной (с 10-дневным интервалом) иммунизации ТСТ на 20-й день от начала эксперимента было произведено в/бр заражение летальной дозой *Y. pseudotuberculosis* (5×10^3 микробных клеток). В сравнении с контрольными животными (зараженными возбудителем псевдотуберкулеза без предварительной иммунизации), выявлено протективное действие ТСТ в дозах 0,02 и 0,1 мкг/мышь (рис. 4).

На фоне 100%-ной гибели животных контрольной группы к 11-м суткам после заражения, иммунизированные животные характеризовались достоверно ($p < 0,05$) более длительным сроком жизни (относительно 20 суток наблюдения). К окончанию срока эксперимента выжило 30-50% животных, иммунизированных ТСТ в дозах 0,002 и 0,1 мкг/мышь.

Обсуждение

Термостабильный токсин *Y. pseudotuberculosis* в исследованных нами дозах проявил иммуногенную и протективную активность. Развитие специфического гуморального иммунного ответа к ТСТ было зарегистрировано при использовании для иммунизации мышей доз токсина в диапазоне доз 0,01-0,1 мкг/мышь, что существенно меньше токсической дозы (LD_{50} для ТСТ = 4,5 мкг/мышь). Как более иммуногенная, нами была выбрана доза ТСТ в 0,1 мкг/мышь, при которой развивался специфический иммунный ответ гуморального типа достоверно ($p < 0,05$) более высокой силы в сравнении с дозой 0,01 мкг/мышь. Именно с этой дозой ТСТ мы считаем целесообразным проведение дальнейших исследований с целью построения на базе этого антигена вакцинной конструкции против возбудителя псевдотуберкулеза. Отметим, однако, что при проведении исследований с использованием модели экспериментальной летальной псевдотуберкулезной инфекции мышей было обнаружено, что меньшая доза ТСТ обеспечивает протективный эффект, несколько превосходящий эффект иммунизации дозой токсина в 0,1 мкг/мышь. Данное обстоятельство может быть обусловлено тем, что меньшая доза токсина вызывает в организме животных другой тип эффектов модуляции системы крови, факторов неспецифической резистентности (например, системы комплемента, фагоцитоза, экспрессии паттерн-распознающих рецепторов фагоцитов и т.п.). Можно предположить и более выраженную стимуляцию механизмов специфического клеточно-опосредованного иммунного ответа в случае использования для иммунизации меньших доз ТСТ. Все эти предположения требуют проведения

соответствующих исследований и подтверждений, а в нашей работе мы нашли подтверждение концепции о разном по направлению и интенсивности модулирующем воздействии доз ТСТ в дозах 0,01 и 0,1 мкг/мышь на систему крови и цитокиновые параметры. Обнаружены различия в лейкоцитарной реакции: развитие лейкопении, нейтро- и лимфопении в случае дозы в 0,01 мкг токсина, тогда как при использовании дозы в 0,1 мкг токсина развивается лейкоцитоз, прирост содержания лимфоцитов и моноцитов. Это в значительной степени может объясняться более высокой активностью GM-CSF у мышей, иммунизированных дозой ТСТ в 0,1 мкг/мышь. Причем повышенный уровень активности GM-CSF определяется в этой группе животных как через 7 суток, так и через 17 суток после иммунизации. Данное обстоятельство можно трактовать как свидетельство более оптимальных условий для клональной экспансии лимфоцитов, специфических к антигенам ТСТ, что выразилось в нашем эксперименте в большей величине гуморального иммунного ответа мышей при иммунизации этой дозой токсина.

Выявлены различия и в цитокин-модулирующей активности разных доз ТСТ. При использовании дозы токсина в 0,01 мкг/мышь активировались преимущественно цитокины, имеющие провоспалительную острофазовую направленность (IL-1, IL-6), тогда как доза токсина в 0,1 мкг вызывала к 17-м суткам эксперимента индукцию $IFN\gamma$ и цитокинов, способствующих пролиферации лимфоцитов и активации антителопродукторов (IL-2, IL-4).

В целом, характеризуя иммунологические свойства данного токсина *Y. pseudotuberculosis*, мы можем оценить его как антиген с умеренной иммуногенной активностью. Замедленная активация антителопродукторов при реакции организма мышей на этот белок делает актуальной задачу поиска эффективных адъювантов – дополнительных средств усиления и ускорения развития специфической гуморальной иммунной реакции на этот антиген. При выполнении этих условий можно предположить, что ТСТ *Y. pseudotuberculosis* может быть использован как протективный антиген для построения на его основе вакцинных конструкций.

Благодарности

Работа поддержана грантами Министерства образования и науки РФ (Гос. задания 172.2014 и 4.583.2011, Госконтракт П340) и Правительства РФ (грант для гос. поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских вузах, контракт 11.G34.31.0010)

Список литературы

1. Воскресенская Е.А., Ценева Г.Я., Аленушкина Т.В., Скворцов А.Е. Иммунологические показатели при патологии, обусловленной иерсиниозами // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1996. – № 5. – С. 68-73.
2. Долматова Л.С., Заика О.А., Недашковская Е. П., Тимченко Н.Ф. Исследование механизмов апоптозмодулирующего влияния термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* и корректирующего действия экстракта из дальневосточных видов голотурий на нейтрофилы крыс *in vitro* // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 3. – С. 76-80.
3. Исачкова Л.М., Разник С.Д., Недашковская Е.П., Тимченко Н.Ф. Патоморфологическая характеристика экспериментальной токсинемии, вызванной термостабильным токсином *Yersinia pseudotuberculosis* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – № 11. – С. 593-597.
4. Кузнецова Т.А., Крылова Н.В., Тимченко Н.Ф., Логвиненко А.А. Влияние термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на иммунную систему // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2002. – № 1. – С. 25-28.
5. Пашин А.С. Совершенствование методов выделения и идентификации экзотоксина псевдотуберкулезного микроба: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1986. – 133 с.
6. Персиянова Е.В., Сурин А.К., Псарева Е.К., Тимченко Н.Ф. Цитотоксический некротизирующий фактор *Yersinia pseudotuberculosis*, возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2013. – Т. 33, № 2. – С. 16-20.
7. Покровский В.К., Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Григорьева Е.А. Биологические свойства термостабильного летального токсина *Yersinia pseudotuberculosis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 6. – С. 63-66.
8. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. – М.: Медицина, 2001. – 238 с.
9. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. – Владивосток, 2004. – 220с.
10. Тимченко Н.Ф. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 6. – С. 83-89.
11. Цыбульский А.В., Попов А.М., Санина Н.М., Мазейка А.Н., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Тимченко Н.Ф., Костецкий Э.Я. Иммуногенные и протективные свойства наноразмерных конструкций на основе тубулярных иммуностимулирующих комплексов и порообразующего белка из *Yersinia pseudotuberculosis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 2. – С. 43-47.

Ссылки 12-14 см. в References (стр. 236). See References for numbers 12-14 at p. 236.

References

1. Voskresenskaya E.A., Tseneva G.Ya., Alenushkina T.V., Skvortsov A.E. Immunologicheskie pokazateli pri patologii, obuslovennoy iersiniozami [The immunological indices in pathology due to yersiniosis]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii – Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*, 1996, no. 5, pp. 68-73.
2. Dolmatova L.S., Zaika O.A., Nedashkovskaya E.P., Timchenko N.F. Issledovanie mekhanizmov apoptozmoduliruyushchego vliyaniya termostabil'nogo toksina *Yersinia pseudotuberculosis* i korrigiruyushchego deystviya ekstrakta iz dal'nevostochnykh vidov goloturiy na neytrofilny krys *in vitro* [Investigation of mechanisms of apoptoz-modulating influence of thermostable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* and corrective effect of the extract of the Far Eastern species of sea cucumbers to the rat neutrophils *in vitro*]. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal – Pacific Medicine Journal*, 2010, no. 3, pp. 76-80.
3. Isachkova L.M., Raznik S.D., Nedashkovskaya E.P., Timchenko N.F. Patomorfologicheskaya kharakteristika eksperimental'noy toksinemii, vyzvannoy termostabil'nym toksinom *Yersinia pseudotuberculosis* [Pathomorphological characteristics of experimental toxemia induced by thermostable *Yersinia pseudotuberculosis* toxin]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2000, vol. 130, no. 11, pp. 1123-1126.
4. Kuznetsova T.A., Krylova N.V., Timchenko N.F., Logvinenko A.A. Vliyanie termostabil'nogo toksina *Yersinia pseudotuberculosis* na immunnuyu sistemu [Effect of heat-stable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* to the immune system]. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni – Epidemiology and Infectious Diseases*, 2002, no. 1, pp. 25-28.

5. Pashin A.C. Sovershenstvovanie metodov vydeleniya i identifikatsii ekzotoksina psevdotuberkuleznogo mikroba. Avtoref. diss. kand. med. nauk [Improvement of methods for isolation and identification of exotoxin pseudotuberculosis bacteria. Autoref. Cand. med. sci. diss.]. *Saratov, 1986. 133 p.*
6. Persiyanova E.V., Surin A.K., Psareva E.K., Timchenko N.F. Tsitotoksicheskiy nekrotiziruyushchiy faktor *Yersinia pseudotuberculosis*, vzbuditelya dal'nevostochnoy skarlatinopodobnoy likhoradki [Cytotoxic necrotizing factor of *Yersinia pseudotuberculosis* as the causative agent of Far Eastern scarlatine-like form fever]. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya RAMN – Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 2013, vol. 33, no. 2, pp. 16-20.*
7. Pokrovskiy V.K., Timchenko N.F., Nedashkovskaya E.P., Grigor'eva E.A. Biologicheskie svoystva termolabil'nogo letal'nogo toksina *Yersinia pseudotuberculosis* [Biological properties of heat-labile lethal toxin of *Yersinia pseudotuberculosis*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii – Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology, 2008, no. 6, pp. 63-66.*
8. Somov G.P., Pokrovskiy V.I., Besednova N.N., Antonenko F.F. Psevdotuberkulez [Pseudotuberculosis]. *Moscow, Medicine, 2001. 238 p.*
9. Timchenko N.F., Nedashkovskaya E.P., Dolmatova L.S., Somova-Isachkova L.M. Toksiny *Yersinia pseudotuberculosis* [Toxins of *Yersinia pseudotuberculosis*]. *Vladivostok, 2004. 220 p.*
10. Timchenko N.F. Toksiny *Yersinia pseudotuberculosis* [*Yersinia pseudotuberculosis* toxins]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii – Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology, 2006, no. 6, pp. 83-89.*
11. Tsybulsky A.V., Popov A.M., Sanina N.M., Mazeyka A.N., Portnyagina O.Yu., Novikova O.D., Timchenko N.F., Kostetsky E.Ya. Immunogennyye i protektivnyye svoystva nanorazmernykh konstruktov na osnove tubulyarnykh immunostimuliruyushchikh kompleksov i poroobrazuyushchego belka iz *Yersinia pseudotuberculosis* [Immunogenic and protective properties of nanosized constructs based on tubular immunostimulating complexes and pore forming protein of *Yersinia pseudotuberculosis*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii – Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology, 2011, no. 2, pp. 43-47.*
12. Carnoy C., Loiez C., Faveeuw C., Grangette C., Desreumaux P., Simonet M. Impact of the *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen (YPM) on the murine immune system. *Adv. Exp. Med. Biol., 2003, vol. 529, pp. 133-135.*
13. Lockman H.A., Gillespie R.A., Baker B.D., Shakhnovich E. *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor. *Infect. Immun., 2002, vol. 70, pp. 2708-2714.*
14. Rosqvist R., Forsberg A., Wolf-Watz H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalia induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun., 1991, vol. 59, no. 12, pp. 4562-4569.*