

УДК 579.852.11:616.981.455;615.37

А.В. Корнева, В.Б. Николаев, К.Ю. Ястремская, Е.Ю. Марков, В.В. Войткова, С.Ю. Соловьев,  
Ю.О. Попова, А.В. Мазепа, Т.А. Иванова, В.С. Половинкина

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ОБОЛОЧЕК *FRANCISELLA TULARENSIS* РАЗНЫХ ПОДВИДОВ (СООБЩЕНИЕ 2)

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

Изучено влияние препаратов клеточных оболочек *Francisella tularensis* четырех подвидов, полученных из мочевинных лизатов туляремийного микроба, на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками экспериментальных животных. Показано стимулирующее влияние препаратов клеточных оболочек *F. tularensis* на синтез цитокинов. Результаты исследований позволяют рассматривать препараты клеточных оболочек *F. tularensis* в качестве компонентов при создании субъединичных вакцин.

**Ключевые слова:** туляремия, *Francisella tularensis*, клеточные оболочки, цитокины, иммунокомпетентные клетки, вакцины

## RESULTS OF THE STUDY OF THE IMMUNOGENIC ACTIVITY OF CELL ENVELOPES OF *FRANCISELLA TULARENSIS* DIFFERENT SUBSPECIES (REPORT 2)

A.V. Korneva, V.B. Nikolaev, K.Yu. Yastremskaya, E.Yu. Markov, V.V. Voytkova,  
S.Yu. Solovyov, Yu.O. Popova, A.V. Mazepa, T.A. Ivanova, V.S. Polovinkina

Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russia

The effect of cell envelopes preparations of four subspecies of *Francisella tularensis*, derived from urea lysates of tularemia microbe on cytokine production by immunocompetent cells of experimental animals has been studied. Stimulating influence of *F. tularensis* cell envelopes preparations on cytokine synthesis on the 7th day after inoculation was shown. The results showed that the cell envelopes of different subspecies *F. tularensis* have different stimulatory effect on the production of proinflammatory cytokines and growth factors GM-CSF and G-CSF, further defining the immune system of host. The results allow to consider cell envelopes preparations of *F. tularensis* as constituent component in the development of subunit vaccines.

**Key words:** tularemia, *Francisella tularensis*, cell membranes, cytokines, immune cells, vaccines

*Francisella tularensis* – возбудитель туляремии, зоонозной инфекции, природные очаги которой широко распространены во всем Северном полушарии в пределах умеренного климатического пояса, в том числе на территории Российской Федерации, и приурочены к различным климатическим зонам с разнообразными ландшафтами. Природным резервуаром данного возбудителя являются главным образом грызуны и зайцеобразные. Заражение происходит контактным, трансмиссивным, алиментарным и аспирационным путями.

В связи высокой вирулентностью и контагиозностью, возможностью заражения аспирационным путем, способностью долго сохраняться во внешней среде *F. tularensis* внесена в список потенциально опасных агентов биотерроризма [4]. Несмотря на достигнутые успехи в изучении туляремийного микроба, механизмы его высокой вирулентности до конца не изучены, что говорит об актуальности исследований возбудителя туляремии для совершенствования диагностики и создания эффективных профилактических препаратов.

Известно, что туляремийный микроб, являясь факультативным внутриклеточным паразитом, способен противостоять бактерицидным системам фагоцитов [7, 10, 11]. При взаимодействии туляремийного микроба с иммунокомпетентными клетками микроорганизма происходит усиленная экспрессия ряда провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО- $\alpha$ ) в организме хозяина, что определяет дальнейшее течение инфекционного процесса.

Важную роль антигенных детерминант поверхностных структур туляремийного микроба, участвующих во взаимодействии с иммунной системой макроорганизма, подтверждают данные о протективной активности наружных мембран, являющихся сложными, многокомпонентными структурами, что делает их перспективными объектами исследования для создания безопасных и эффективных вакцин и диагностических препаратов [1, 3, 8].

Одним из важнейших аспектов в изучении влияния клеточных оболочек как комплексных антигенных препаратов туляремийного микроба является оценка иммунного статуса экспериментальных животных, в частности продукции цитокинов клетками иммунофагоцитарной системы.

**Цель работы:** изучение влияния препаратов клеточных оболочек *F. tularensis* разных подвидов, полученных из мочевинных лизатов туляремийного микроба, на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками экспериментальных животных.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы шесть штаммов живых культур: *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 (авирулентен для белых мышей в дозах 10–100 м.к.), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 (ЛД<sub>50</sub> для белых мышей – 1 м.к.), *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 21/400, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ

(вакцинный, ЛД<sub>50</sub> для белых мышей – 2 × 10<sup>6</sup> м.к.), полученных из музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института.

Обеззараженные препараты клеточных оболочек получали лизисом живых клеток *F. tularensis* раствором мочевины. К суспензии микробных клеток в 0,9%-м растворе NaCl в равном объеме (1 : 1) добавляли 9 М раствор мочевины до достижения конечной концентрации 4,5 М, инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С. Лизат микробных клеток, прошедший контроль специфической стерильности, подвергали центрифугированию при 10 000.g в течение 30 минут для освобождения от крупных фрагментов разрушенных клеток. Фракции клеточных оболочек получали центрифугированием осветленного лизата при 40 000.g в течение 60 минут.

Содержание белка определяли по методу О.Н. Lowry с соавт. [9] или в его модификациях [12, 14], углеводов – в реакции с фенолом [5] после гидролиза препаратов в 2 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в течение 2 часов при 95 °С. Содержание белка в препаратах варьировало от 43 до 78 % сухой массы, углеводов – от 20 до 38 %.

В опыте были использованы 40 самцов сертифицированных белых беспородных мышей (НПО «Вектор», г. Новосибирск) массой 18–20 г (по 5 особей в группе). Животных выводили из эксперимента в соответствии с утвержденными правилами лабораторной практики (Приказ Минздрава России от 19.06.2003 г. № 267).

Подопытных животных распределили на 7 групп. Белым мышам шести опытных групп вводили подкожно в объеме 0,2 мл забуференный физиологический раствор (ЗФР) pH 7,2, в дозе 19 мкг следующие препараты клеточных оболочек: *F. tularensis* Utah 112; *F. tularensis* A-61; *F. tularensis* B-399 A-Cole; *F. tularensis* 21/400; *F. tularensis* 306 и *F. tularensis* 15НИИЭГ. Контрольной группой служили мыши, получившие подкожно по 0,2 мл ЗФР. Кровь у подопытных животных забирали из хвостовой вены. Плазму крови получали центрифугированием (10 000.g при 4 °С в течение 15 минут), в качестве антикоагулянта использовали 129 мМ цитратный буфер pH 7,4.

Содержание в плазме крови гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и колониестимулирующего фактора гранулоцитов (Г-КСФ) оценивали в динамике на 3-и, 7-е и 21-е сутки

после инокуляции животным исследуемых препаратов. Для определения концентрации цитокинов использовали метод проточной флюорометрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-Plex 200 System (Bio-Rad, США). В работе использовали коммерческие тест-системы Bio-Plex ProMouse Cytokine Standard Group I 23-Plex (Bio-Rad, США). Содержание цитокинов в плазме крови анализировали в трех повторах. Концентрацию цитокинов в плазме крови выражали в пкг/мл. Обработку данных осуществляли с помощью программы Bio-Plex Manager 5.0 Properties.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартного пакета прикладных программ Statistica 6.0 (© StatSoft Inc., 19842001, ИПЧИ 31415926535897) с использованием U-критерия Манна – Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$  и  $p \leq 0,01$ ;  $n = 15$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что уровень цитокинов в плазме крови у животных контрольной группы в среднем не превышал 1 пкг/мл.

Оценка изменения уровней цитокинов в крови экспериментальных животных на 3-и, 7-е и 21-е сутки выявила значительное увеличение синтеза ГМ-КСФ и Г-КСФ на 7-е сутки после иммунизации.

Препараты клеточных оболочек штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 и *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 проявили наибольшее стимулирующее влияние на производство Г-КСФ ( $p \leq 0,01$  и  $p \leq 0,05$  соответственно). Иммунизация животных препаратами клеточных оболочек туляремийного микроба subsp. *tularensis* и subsp. *holarctica* также вызвало рост концентрации Г-КСФ в их крови, но полученные значения выходили за пределы статистической значимости (рис. 1).

Заметное увеличение синтеза ГМ-КСФ было зафиксировано в ответ на введение животным препарата *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 ( $p \leq 0,05$ ), в остальных случаях уровень исследуемого цитокина оставался в пределах значений контрольной группы (рис. 2).

На 21-е сутки после инокуляции препаратов экспериментальным животным уровни Г-КСФ и ГМ-КСФ снизились до значений, не определяемых данным методом.

Ранее мы показали, что иммунизация экспериментальных животных препаратами клеточных оболочек

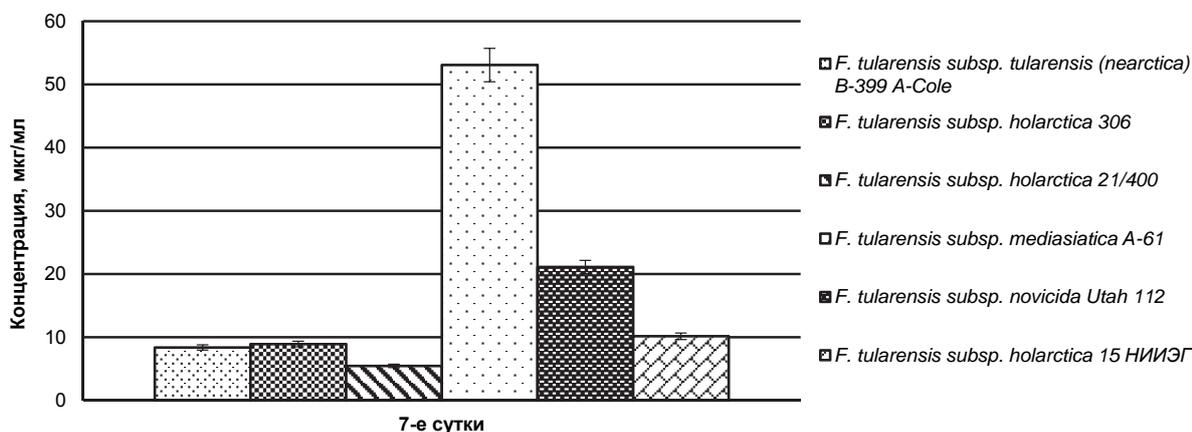


Рис. 1. Синтез Г-КСФ в ответ на иммунизацию белых мышей препаратами клеточных оболочек *F. tularensis* разных подвидов.

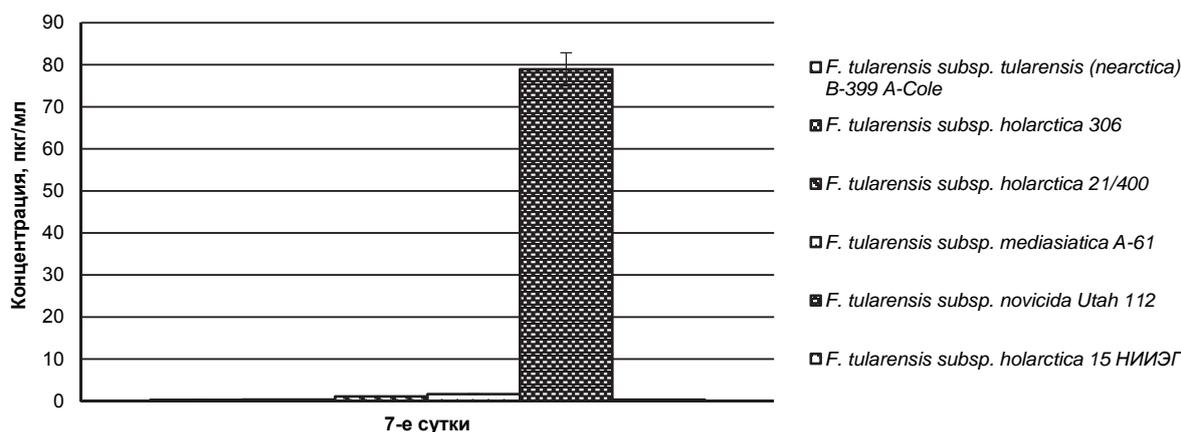


Рис. 2. Синтез ГМ-КСФ в ответ на иммунизацию белых мышей препаратами клеточных оболочек *F. tularensis*.

*F. tularensis* некоторых штаммов влечет увеличение синтеза провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО-α на 3-и и 7-е сутки [2]. Известно, что секреция колониестимулирующих факторов значительно возрастает под влиянием провоспалительных цитокинов, что приводит к усилению миелопоэза. Следует отметить, что в нашем эксперименте повышение уровня исследуемых ростовых факторов в крови подопытных животных на 7-е сутки наблюдалось на фоне высокого содержания ФНО-α и ИЛ-2 и снижающегося уровня ИЛ-1β.

Продукция ростовых факторов Г-КСФ и ГМ-КСФ моноцитами и макрофагами инициируется воздействием бактериальных липополисахаридов и является сигналом для активации воспалительной реакции в ответ на вторжение патогенных микроорганизмов. Кроме того, бактериальные антигены индуцируют синтез ГМ-КСФ Т-лимфоцитами, активируя таким образом пролиферацию моноцитов и макрофагов в рамках специфического иммунного ответа. Циркулирующий эндогенный Г-КСФ, как правило, не обнаруживается в крови здоровых животных, однако, во время острого инфекционного процесса концентрация Г-КСФ многократно возрастает вслед за провоспалительными цитокинами [13], что мы и наблюдали в настоящем исследовании.

В противоположность Г-КСФ, эндогенный ГМ-КСФ редко обнаруживается в крови животных даже в период острой инфекции [6], что, вероятно, связано с действием ГМ-КСФ на более локальном уровне, в отличие от системного влияния Г-КСФ на образование нейтрофилов в организме хозяина. Тем не менее, как уже отмечалось выше, иммунизация экспериментальных животных препаратами клеточных оболочек *F. tularensis* привела к повышению уровня ГМ-КСФ на 7-е сутки, особенно в случае *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить особенности взаимодействия клеточных оболочек *F. tularensis* разных подвигов, являющихся комплексными антигенными препаратами возбудителя туляремии, *in vivo* с факторами естественной резистентности организма экспериментальных животных.

Полученные результаты имеют значение для расширения представлений о развитии воспалительной реакции, вызванной препаратами клеточных оболочек *F. tularensis* при подкожном пути их внедрения в макроорганизм.

Результаты исследования показали, что клеточные оболочки *F. tularensis* разных подвигов оказывают разное стимулирующее действие на продукцию цитокинов ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-2 [2] и ростовых факторов ГМ-КСФ и Г-КСФ, определяя дальнейшую работу иммунной системы макроорганизма.

Полученные данные могут быть использованы для дальнейших теоретических и практических разработок в области изучения взаимодействия макро- и микроорганизмов при заражении разными подвидами *F. tularensis*, а также при разработке методических подходов к созданию эффективных вакцинных препаратов на основе клеточных оболочек возбудителя туляремии.

#### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Дубровина В.И. Функциональные особенности фагоцитов при инфекционном и вакцинальном процессе, вызываемом *Francisella tularensis*. – Иркутск, 2002. – 119 с.
2. Dubrovina VI (2002). Functional features of phagocytes at infectious and vaccinal process caused by *Francisella tularensis* [Funkcionalnye osobennosti fagocitov pri infekcionnom i vakcinalnom processe, vyzyvaемом *Francisella tularensis*], 119.
3. Корнева А.В., Николаев В.Б., Ястремская К.Ю., Марков Е.Ю., Войткова В.В., Соловьев С.Ю., Попова Ю.О., Мазепа А.В., Половинкина В.С. Результаты изучения иммуногенной активности клеточных оболочек *Francisella tularensis* разных подвигов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 4 (77). – С. 73–77.
4. Korneva AV, Nikolaev VB, Yastremskaya KY, Markov EY, Voytkova VV, Solovyov SY, Popova YO, Mazepa AV, Polovinkina VS (2014). Results of the study of the immunogenic activity of cellular membranes of different subspecies of *Francisella tularensis* [Rezultaty izucheniya immunogennoj aktivnosti kletochnykh obolochek *Francisella tularensis* raznykh podvidov]. *Jepidemiologija i vakcinoprofilaktika*, 4 (77), 73-77.
5. Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Загоскина Т.Ю., Половинкина В.С., Иванова Т.А., Саппо С.Г., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Голубинский Е.П. Протективная активность субклеточных фракций *Yersinia pestis* при экспериментальной чуме у белых мышей // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2004. – № 3 (64). – С. 123–127.
6. Markov EY, Nikolaev VB, Zagoskina TY, Polovinkina VS, Ivanova TA, Sappo SG, Andreevskaya NM, Mikhaylova VA,

Golubinskiy EP (2004). Protective activity of *Yersinia pestis* subcellular fractions at experimental plague in white mice [Protektivnaya aktivnost subkletochnykh frakcij *Yersinia pestis* pri eksperimentalnoj chume u belyx myshej]. *Bjull. VSNC SO RAMN*, 3 (64), 123-127.

4. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Бiotерроризм: национальная и глобальная угроза // Вестник РАН. – 2003. – № 3 (73). – С. 195–204.

Onishchenko GG, Sandakhchiev LS, Netesov SV, Martynyuk RA (2003). Bioterrorism: national and global threat [Bioterrorizm: nacionalnaya i globalnaya ugroza]. *Vestnik RAN*, 3 (73), 195-204.

5. Хансон Р., Филлипс Дж. Химический состав бактериальной клетки. Методы общей бактериологии. – Москва: Мир, 1984. – С. 283–373.

Hanson R, Phillips G (1984). Chemical composition of the bacterial cells. Manual of methods for general bacteriology [*Himicheskiy sostav bakterialnoj kletki. metody obshhej bakteriiologii*], 283-373.

6. Cebon J, Layton JE, Maher D, Morstyn G (1994). Endogenous haematopoietic growth factors in neutropenia and infection. *Br. J. Haematol.*, 86, 265-274.

7. Fortier AH, Green SJ, Polsinelli T, Jones TR, Crawford RM, Leiby DA, Elkins KL, Meltzer MS, Nacy CA (1994). Life and death of an intracellular pathogen: *Francisella tularensis* and the macrophage. *Immunol. Ser.*, 60, 349-361.

8. Huntley JF, Conley PG, Rasko DA, Hagman KE, Apicella MA, Norgard MV (2008). Native outer membrane proteins protect mice against pulmonary challenge with virulent type A *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.*, 76, 3664-3671.

9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1), 265-275.

10. Mohapatra NP, Soni S, Murugesan R, Dang M, Reilly TJ, Elbenna J, Schlesinger LS, Gunn JS (2010). *Francisella* acid phosphatases inactivate NADPH oxidase complex components in human phagocytes by dephosphorylation. *J. Immun.*, 184 (9), 5141.

11. Oyston PCF (2008). *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *J. Med. Microbiol.*, 57 (8), 921-930.

12. Peterson GL (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83 (2), 346-356.

13. Root RK, Dale DC (1999). Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: comparisons and potential for use in the treatment of infections in nonneutropenic patients. *J. Infect. Dis.*, 179, 342-352.

14. Zaman Z, Verwilghem RL (1979). Quantitation of proteins solubilized in sodium dodecyl sulfate-mercaptoethanol-tris electrophoresis buffer. *Anal. Biochem.*, 100 (1), 64-69.

#### Сведения об авторах

#### Information about the authors

**Корнева Александра Владимировна** – лаборант-исследователь биохимического отдела, ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 68-36-63, 8 (3952) 22-01-35; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

**Korneva Alexandra Vladimirovna** – Research Assistant of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор (664007, Irkutsk, ul. Trilissera, 78; tel.: +7 (3952) 22-01-35, 8 (3952) 22-01-35; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

**Николаев Валерий Борисович** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник биохимического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

**Nikolaev Valeriy Borisovich** – Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор

**Ястремская Ксения Юрьевна** – младший научный сотрудник биохимического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

**Yastremskaya Kseniya Yurjevna** – Junior Research Officer of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор

**Марков Евгений Юрьевич** – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий биохимическим отделом ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

**Markov Evgeniy Yurjevich** – Doctor of Biological Sciences, Senior Research Officer, Head of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор

**Войткова Валентина Владимировна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

**Voitkova Valentina Vladimirovna** – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор

**Соловьев Сергей Юрьевич** – лаборант-исследователь биохимического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

**Soloviev Sergey Yurjevich** – Research Assistant of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор

**Попова Юлия Олеговна** – лаборант биохимического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

**Popova Yulia Olegovna** – Laboratory Assistant of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор

**Мазепа Андрей Владимирович** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела зоонозных инфекций ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

**Mazepa Andrey Vladimirovich** – Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer of the Department of Zoonotic Infections of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор

**Иванова Татьяна Александровна** – заведующая лабораторией экспериментальных животных ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

**Ivanova Tatyana Aleksandrovna** – Head of the Laboratory of Experimental Animals of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор

**Половинкина Валерия Сергеевна** – научный сотрудник биохимического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

**Polovinkina Valeriya Sergeevna** – Research Officer of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор