



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

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИММУНОГЕННОЙ И ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

*Под редакцией профессора
С.В. Балахонова*



Иркутск — 2024

**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**

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
СИНТЕТИЧЕСКОГО
СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКОГО
СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ИММУНОГЕННОЙ И ПРОТЕКТИВНОЙ
АКТИВНОСТИ ВАКЦИННЫХ
ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

Под редакцией профессора
С.В. Балахонова

Иркутск – 2024

УДК 616-092:579.841.95

ББК 55.14

П27

Перспективы использования синтетического селенорганического соединения для повышения иммуногенной и протективной активности вакцинных штаммов возбудителей опасных инфекционных болезней / Под ред. профессора С.В. Балахонова. – Иркутск: ИНЦХТ, 2024. – 108 с.

ISBN 978-5-98277-411-8

В монографии излагаются современные сведения о вакцинальном процессе при чуме, туляремии и сибирской язве на фоне иммуномодуляции. В ней приводятся сведения, касающиеся особенностей реализации факторов патогенности, позволяющие возбудителям этих особо опасных инфекций преодолевать действие неспецифических и специфических механизмов защиты макроорганизма.

Монография предназначена для широкого круга специалистов, включая научных сотрудников, врачей-ординаторов и студентов, занимающихся проблемами микробиологии, патофизиологии и иммунологии возбудителей особо опасных инфекций.

Табл. 17. Ил 43. Библиогр.: 78 назв.

Авторы:

*В.И. Дубровина, К.М. Корытов, А.Б. Пятидесятникова, Витязева С.А.,
Юрьева О.В., Старовойтова Т.П., Брюхова Д.Д., Иванова Т.А.,
Колесникова О.Б., Кравец Е.В., Мазепа А.В., Мухтургин Г.Б., Рыбкин И.С.,
Шпилова Д.Н., Мусалов М.В., Потапов В.А., Балахонов С.В.*

Рецензенты:

*В.А. Вишняков – заведующий изолятором, врач-инфекционист
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, кандидат медицинских наук*

*Ж.А. Коновалова – старший научный сотрудник ФКУЗ Иркутский
научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
кандидат биологических наук*

ISBN 978-5-98277-411-8



© ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора, 2024

© Коллектив авторов, 2024

© ФГБНУ «ИНЦХТ», 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО И ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ВАКЦИНАЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ, ВЫЗВАННЫХ ЖИВЫМИ АТТЕНУИРОВАННЫМИ ВАКЦИНАМИ ПРОТИВ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ	12
ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ	23
2.1. Влияние экспериментального препарата 974zh на индекс соотношения цАМФ/цГМФ в тимусе и селезенке белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом <i>Y. pestis</i> EV	23
2.2. Структурная перестройка органов белых мышей, вакцинированных <i>Y. pestis</i> EV в сочетании с селенорганическим соединением 974zh	27
2.3. Влияние синтетического селеноорганического соединения на поствакцинальный иммунопоэз в красном костном мозге и клеточный состав периферической крови белых мышей, вакцинированных <i>Y. pestis</i> EV	39
2.4. Влияние синтетического селеноорганического препарата на степень патоморфологических изменений органов белых мышей, иммунизированных туляреминой и бруцеллезной вакцинами	44
2.5. Особенности изменения в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных в динамике вакцинального процесса, вызванного <i>Bacillus anthracis</i> в сочетании с селеноорганическим соединением	47

2.6. Морфологические и функциональные изменения в тимусе и надпочечниках экспериментальных животных в динамике вакцинального процесса, вызванного <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ в сочетании с селеноорганическим соединением	62
2.7. Влияние селеноорганического соединения 974zh на экспрессию генов <i>TLR2</i> и <i>TLR4</i> в клетках крови и селезенки экспериментальных животных при совместном введении с <i>Y. pestis</i> EV и <i>F. tularensis</i> 15 .	74
2.8. Влияния селеноорганического соединения 974zh на динамику показателей иммунокомпетентных клеток крови белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом <i>Y. pestis</i> EV	83
2.9. Действие препарата 974zh на протективные свойства вакцинных штаммов	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	99

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АФК	– Активные формы кислорода
ВЖЧ	– вакцина живая чумная
ВрАг	– комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ж.м.к.	– живые микробные клетки
ЗФР	– забуференный 0,9 % раствор хлорида натрия pH 7,2
ИРИ	– иммунорегуляторный индекс
ИТЛС	– иммуностропных лекарственных средств
ИФА	– иммуноферментный анализ
КО	– клеточные оболочки
КС	– коэффициент стимуляции
мг	– миллиграмм
МДП	– мурамилдипептид
МЕ	– международная единица
мин	– минута
МКАТ	– моноклональные антитела
мкг	– микрограмм
мкл	– микролитр
мл	– миллилитр
МНС	– major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости
нм	– нанометры
об/мин	– обороты в минуту
ОК	– относительная концентрация
ОП	– оптическая плотность
пг	– пикограмм
сек	– секунда

см	– сантиметр
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ТМБ	– тетраметилбензидин
у.е.	– условная единица
ФСБ	– фосфатно-солевой буферный раствор
ФСБ-Т	– фосфатно-солевой буферный раствор с твином
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
CD	– кластер дифференциации
g	– ускорение свободного падения
HLA	– human leucocyte antigens, лейкоцитарные антигены человека
ConA	– конканавалин А
F1	– капсульный антиген чумного микроба
IFN- γ	– интерферон- γ
Ig	– иммуноглобулин
IL	– интерлейкин
Me	– медиана
NK	– натуральные киллерные клетки
PRR	– патоген распознающих рецепторов
Q ₂₅ %–Q ₇₅ %	– интерквартильный размах
Th	– Т-хелперы
TLR	– Толл подобные рецепторы
TNF- α	– фактор некроза опухоли α
rs	– коэффициент корреляции

ВВЕДЕНИЕ

Успешная профилактика инфекционных заболеваний, в том числе особо опасных, в значительной степени зависит от эффективности и безопасности вакцинных препаратов.

В настоящее время почти все вакцины, используемые для профилактики особо опасных инфекций, представляют собой живые аттенуированные штаммы возбудителей соответствующих заболеваний, обладают остаточной вирулентностью, сенсибилизирующим действием и реактогенностью. Последние десятилетия основной задачей вакцинологии являлось выделение из патогенных микроорганизмов субстанций и молекул, обладающих иммуногенными и протективными свойствами, но не вызывающих патологические реакции [1]. Однако, несмотря на многочисленные попытки создания корпускулярных, химических, молекулярных, субъединичных и комбинированных вакцин против особо опасных инфекций, ни одна из них не смогла сравниться по эффективности с живой вакциной, поскольку аттенуированные патогенные микроорганизмы, в отличие от их отдельных компонентов, обладают всей совокупностью иммуногенных и протективных факторов, позволяющих организму развивать при вакцинальном процессе полноценный стойкий и продолжительный иммунитет. Предпринимаются попытки решить проблемы реактогенности живых вакцин и слабой иммуногенности химических, молекулярных и субъединичных при помощи введения в вакцинальный процесс неспецифических факторов, способствующих снижению негативного влияния и/или повышению иммунологической эффективности иммунизации на макроорганизм [2].

К таким факторам можно отнести действие природных и синтетических иммуностропных препаратов, способных повышать формирование адаптивного иммунного ответа и резистентность организма.

К настоящему времени изучено биологическое действие множества иммуностропных препаратов или иммуностропных лекарственных средств (ИТЛС) как самостоятельных средств неспецифической иммунокоррекции [3, 4]. Пока не существует единой унифицированной классификации иммуностропных веществ. В зависимости от происхождения ИТЛС разделяют на продукты микробного, растительного,

физиологического или эндогенного происхождения, синтетические, рекомбинантные препараты, иммуносупрессоры, комплексные ферментные препараты, витамины и антиоксидантные комплексы.

В качестве иммуноадьювантов исследованы такие соединения как мурамилдипептид (МДП), входящий в состав пептидогликана всех известных бактерий и его производные [5, 6]. Показано, что МДП может индуцировать механизмы резистентности, благодаря активизации иммунокомпетентных клеток и синтеза некоторых цитокинов. Также изучены иммуноадьювантные свойства металлосодержащих наноконпозитов на основе природного полисахарида арабиногалактана [2].

Установлено, что некоторые природные и синтетические наноструктурированные полимерные композиты могут быть использованы для иммобилизации и создания «депо» антигена. С одной стороны, такие конструкции играют роль матрицы для создания агрегированных комплексов, содержащих антигены и/или иммуногенные препараты, а с другой, имитируют размер и морфологию клеток возбудителей более пригодных для захвата макрофагами, чем изолированные антигены.

Также при изучении действия вакцин и иммунобиологических препаратов исследователи большое внимание уделяют поствакцинальным реакциям организма, таким как аллергияция и интоксикация, свойственные некоторым живым вакцинам. Одним из биохимических процессов, ассоциированных с этими реакциями, является окислительный стресс, который развивается в результате повышенной генерации активных форм кислорода (АФК) клетками. Повышенная продукция АФК при осложнении вакцинального процесса, может привести к воспалительным и аллергическим реакциям, в основе которых лежит процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ). Перекисные производные ненасыщенных жирных кислот клеточных мембран участвуют в биосинтезе простагландинов и лейкотриенов (медиаторов воспаления и аллергических реакций). По мере накопления АФК в макроорганизме мобилизуется множество механизмов, в число которых входят ферменты, утилизирующие H_2O_2 . При нормальном течении вакцинального процесса патогенное влияние АФК может быть нейтрализовано активированной антиоксидантной системой. Однако при недостаточной емкости компенсаторных ресурсов активация ПОЛ может привести к дестабилизации клеточных мембран и последующим патологическим процессам [7]. Это приводит к накоплению в крови

иммуносупрессивных факторов (ацилгидроперекисей, диеновых конъюгатов жирных кислот, малонового диальдегида, аномальных метаболитов липидного обмена), разобщению окислительного фосфорилирования, снижению энергообеспечения клеток, угнетению синтеза ферментов и, как следствие, формированию иммунодефицитных состояний [8, 9]. Накопление в организме малондиальдегида служит маркером активации ПОЛ, который является одним из универсальных критериев реактогенности вакцин и иммунобиологических препаратов. В этом случае целесообразно включать в вакцинальный процесс средства метаболической коррекции, повышающие антиоксидантный потенциал. В число субстанций, снижающих патологическое влияние окислительного стресса на гомеостаз, входят селенорганические соединения природного и синтетического происхождения. Эти соединения могут проявлять различную биологическую активность, например, снижать окислительный стресс, участвовать в регуляции сигнальных систем, влиять на уровень цитокинов и др. Показано, что многие селенорганические соединения обладают низкой общей токсичностью, что делает их перспективными продуктами для разработки новых средств метаболической коррекции вакцинального процесса [3, 10, 11, 12]. Кроме того, антиоксидантной и иммуностропной активностью также обладают вторичные метаболиты лекарственных растений [13]. В связи с этим изучение новых растительных препаратов, соединений природного и синтетического происхождения становится важной областью исследований в поисках адъювантов для вакцин нового поколения [14, 15].

При изучении эффектов иммуностропных субстанций важно определить арсенал критериев и методов оценки иммунного и метаболического статуса макроорганизма. Известно, что индукция иммуногенеза при иммунизации опосредована взаимодействием рецепторов особого семейства патоген распознающих рецепторов PRR (Pattern Recognition Receptors) с молекулярными структурами патогена. Первыми из этого семейства были идентифицированы Toll-подобные рецепторы (TLR), представленные трансмембранными белками. TLR распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунный ответ, играя, таким образом, ключевую роль во врожденном иммунном ответе [16]. С момента открытия механизмов распознавания патогена исследователи уделяют большое внимание поискам лиган-

дов для TLR. Очевидно, что немаловажным показателем в изучении эффективности иммунобиологических препаратов является оценка их способности влиять на экспрессию TLR [17].

Известно, что иммуногенез находится под нейроэндокринным контролем. Ключевую роль в передаче и амплификации сигналов нейромедиаторов и гормонов, не способных проникать в клетку, играет система циклических нуклеотидов. Антиген-индуцированные изменения в содержании циклических нуклеотидов (ЦН) исследователи используют в качестве интегрального показателя, позволяющего прогнозировать развитие иммунных процессов. Накопление гуанозин-3,5-циклического монофосфата (цГМФ) в клетках связывают с их пролиферацией, а аденозин 3,5-циклического монофосфата (цАМФ) – с дифференцировкой. ЦН принимают участие в регуляции функционирования фагоцитирующих клеток, в том числе их поглотительной способности [18]. Показана эффективность производного цГМФ *c-di GMP* в качестве иммуноадаьюванта вакцины против пневмококковой инфекции [19]. Прямыми показателями иммунологической перестройки является активация синтеза интерлейкинов, изменение субпопуляционного состава лимфоцитов крови и морфофункционального состояния иммунокомпетентных органов.

Ранее нами были продемонстрированы сведения о наноструктурированных серебро-, железо- и кобальтсодержащих композитах, сконструированных на матрицах природных полисахаридов: арабиногалактане, галактоманнани, а также синтетическом полимере 1,2,4-триазоле. Рассмотрены перспективы их использования в качестве полимерной биологически активной матрицы для направленного транспорта лекарственных веществ [2].

В связи с вышеизложенным, изучение действия природных и синтетических иммуностропных препаратов, способных повышать формирование адаптивного иммунного ответа и резистентность организма, является актуальным направлением исследований. Получение новых сведений о влиянии биологически активных природных и синтетических соединений на формирование поствакцинального иммунитета и метаболического статуса может послужить основой для разработки методов оптимизации вакцинального процесса.

Одним из актуальных направлений, связанных с изучением иммуногенеза и, соответственно, иммунопрофилактики инфекционных

болезней является получение иммуногенных препаратов, способных потенцировать реакции клеточного иммунитета макроорганизма.

В настоящей монографии обобщены литературные данные и приведены результаты собственных исследований, связанные с изучением механизмов фагоцитоза и выяснением роли клеточного и гуморального иммунитета в формировании резистентности организма к чуме, туляремии и сибирской язве, а также разработка на этой основе принципов повышения функциональной активности фагоцитов с помощью иммуномодуляторов.

Надеемся, что наш совместный труд окажется полезным для специалистов в области особо опасных инфекций, а также принесет пользу научным сотрудникам, работающим над проблемой повышения резистентности организма к чуме.

Возможно, что не все разделы монографии смогут полностью удовлетворить взыскательного читателя, поэтому мы с благодарностью примем все критические замечания, пожелания по обсужденным в монографии вопросам.

Полагаем своим приятным долгом выразить глубокую благодарность сотрудникам Иркутского ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока за большую помощь в проведении совместных экспериментов и обсуждении полученных результатов.

ГЛАВА 1

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО И ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ВАКЦИНАЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ, ВЫЗВАННЫХ ЖИВЫМИ АТТЕНУИРОВАННЫМИ ВАКЦИНАМИ ПРОТИВ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Эффективность специфической профилактики инфекционных заболеваний, в том числе особо опасных, в значительной степени зависит от эффективности и безопасности вакцин. Поиски неспецифических факторов для оптимизации иммуногенеза при вакцинации проводились на протяжении всей истории вакцинопрофилактики. Для повышения эффективности специфической иммунопрофилактики в качестве адъювантов (лат. *adjuvans* – помогающий) использовали различные субстанции и соединения как природного, так и синтетического происхождения. Практически все сертифицированные вакцины против особо опасных инфекций представляют собой аттенуированные штаммы патогенов, обладающие остаточной вирулентностью. Исследования в области совершенствования вакцинопрофилактики длительное время были связаны с поиском отдельных иммуногенных субстанций и молекулярных структур микробного происхождения, не вызывающих побочные реакции. Многие иммунобиологические препараты, содержащие антигены конструировали по принципу корпускул, имитирующих размер и морфологию возбудителя, пригодную для захвата макрофагами. Целью работы по созданию таких препаратов также явилось возможность иммобилизации молекул антигенов и их адресной доставки. Как показали исследования, эффективность иммунных реакций при вакцинации может быть повышена не только за счет иммобилизации антигенов. Кроме того, полученные в результате исследований искусственные иммунобиологические препараты

для специфической профилактики особо опасных инфекций по своей эффективности уступали живым вакцинам. В связи с этим, появился интерес к поиску новых методов оптимизации вакцинального процесса, вызванного живыми вакцинами. По мере накопления сведений о механизмах иммуногенеза и влиянии неспецифических факторов на вакцинальный процесс, появилось понятие «иммунологические адъюванты». Эти вещества представляют собой иммуностропные субстанции или соединения природного или синтетического происхождения. Привнесение в вакцинальный процесс дополнительных факторов, способных влиять на иммуногенез, позволит уменьшить дозу живой вакцины, и, таким образом, снизить ее реактогенность [20].

Одним из ключевых факторов, ассоциированных с реактогенностью живых вакцин, является накопление АФК. Повышение уровня АФК может привести к активации ПОЛ и развитию аллергических и воспалительных реакций. В случае осложнения вакцинального процесса антиоксидантная система макроорганизма не справляется с накопившимися АФК и развивается интоксикация, которая может привести к формированию иммунодефицитных состояний [21]. Среди соединений, способных повышать антиоксидантный и противовоспалительный потенциал организма, особое место занимают селенорганические соединения [22, 23].

Антиоксидантная и противовоспалительная активность селена (Se) хорошо изучена. Вместе с тем последние исследования показали, что некоторые селенорганические соединения обладают иммуностропными свойствами [24].

Патологии, связанные с дефицитом диетического селена

Известно, что многие патологии, в том числе инфекционные, связаны с воспалительным процессом, который в свою очередь опосредован образованием избыточной концентрации АФК. Хорошо изучено корректирующее действие препаратов Se на воспалительный процесс. Установлено, что дефицит Se и подавление экспрессии селенопротеинов является причиной повышения уровня воспалительных цитокинов во многих тканях. Показан гепатопротекторный эффект дрожжей, обогащенных селеном на хроническое повреждение печени у крыс, вызванное тетрахлоридом углерода [25]. Препарат Se модулировал воспалительный процесс у пациентов с респираторным дистресс-син-

дროмом путем восстановления антиоксидантного потенциала легких, компенсируя воспалительные реакции через интерлейкин (IL-1 β), уровни IL-6 и значительно улучшили дыхательную механику [26].

Таким образом, Se участвует в большинстве физиологических и биохимических процессов в клетке, поэтому очевидно, что он обладает большим потенциалом для воздействия на иммунную систему. Адекватные уровни Se необходимы для активности практически всех компонентов иммунной системы.

Иммунотропные свойства и адъювантные эффекты Se

К настоящему времени накоплено достаточно данных, свидетельствующих о том, что изменения в статусе Se могут влиять не только на воспалительные, но и на иммунные реакции. Препараты Se стимулируют многие компоненты иммунной системы, включая пролиферацию Т-клеток, активность натуральных киллеров (NK), функции врожденных иммунных клеток, например, активацию макрофагов, экспрессию рецепторов интерлейкина. Препараты Se влияют на сдвиг баланса Т-хелперов 1/Т-хелперов 2 (Th1/Th2) в сторону Th1. Показано, что при адекватном уровне, Se может способствовать пролиферации и дифференцировке наивных CD4-позитивных Т-лимфоцитов в сторону Th1, поддерживая таким образом напряженный клеточный иммунный ответ и др. [24]. Se также ингибировал индуцированный сальмонеллами апоптоз куриных макрофагов [27].

В последнее десятилетие появляется все больше исследований, посвященных изучению иммуноадъювантных свойств соединений, содержащих селен. Препарат Se повышал выработку антител в организме при вакцинации против гриппа у пожилых людей. Авторы полагают, что Se способен индуцировать оптимальный иммунный ответ при вакцинации против гриппа у пожилых людей [28]. Наночастицы Se (SeNPS) совместно с поверхностным антигеном гепатита В индуцировали устойчивое повышение уровня цитокинов Th1 и интерферона- γ (IFN- γ) у мышей. Как известно, Th1 способствуют развитию клеточного иммунного ответа, активируя макрофаги [29].

Совместное введение Se с противодифтерийной вакциной оказывало положительное влияние на образование титров антител против дифтерии, чем повышало эффективность самой вакцины. Среди эффектов повышения статуса Se, авторы данной работы перечисляют

усиление вторичного гуморального иммунного ответа, активацию, увеличение количества фагоцитов, цитотоксических лимфоцитов (NK-клеток) и активированных лимфоцитов, что позволяет обобщить роль Se в поддержании статуса клеточного иммунитета [30].

Исследован иммуноадьювантный эффект наночастиц селена в ассоциированной с лизатом опухоли молочной железы вакцине (SeNP) [12]. У мышей, инъецированных SeNP, отмечали значительное увеличение уровня IFN- γ , IL-2, IL-12 и снижение трансформирующего фактора роста (TGF)- β в сыворотке крови. Авторы данной работы полагают, что SeNP можно рассматривать в качестве иммуноадьюванта при вакцинации против рака молочной железы [31].

Вакцина против псевдобешенства свиней aPrV, введенная совместно с селенитом натрия, вызывала значительно более активный иммунный ответ, чем вакцина, введенная без него. Se способствовал усилению продукции специфических иммуноглобулинов (Ig), секреции Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-12) и Th2-типа (IL-4, IL-6, IL-10), цитолитической активности NK-клеток и пролиферации лимфоцитов. Кроме того, вакцина совместно с селенитом натрия обеспечивала гораздо более высокую устойчивость мышей к заражению вирусом полевого вируса псевдобешенства (fPrV) [32].

Селенит натрия в сочетании с сапонинами женьшеня (GSLS-Se) повышал эффективность живой двухвалентной вакцины против псевдочумы птиц и вируса инфекционного бронхита (IBV). Селеносодержащий препарат GSLS-Se повышал титры NDV и IBV специфических антител, способных нейтрализовать возбудителей. GSLS-Se также активировал пролиферацию лимфоцитов и выработку IFN- γ и IL-4. Кроме того, препарат способствовал более ранней и более продолжительной продукции антител [33].

Изучены адьювантные свойства мицелл из неионогенных детергентов, липосом и наночастиц селена, содержащих внеклеточные и внутриклеточные антигены слабо вирулентного α -гемолитического штамма *Escherichia coli* B-5, используемого для иммунизации экспериментальных животных. Авторы полагают, что мицеллы, липосомы и наночастицы селена могут быть использованы для иммунизации клеточными и внеклеточными антигенами *E. coli* [34].

Известно, что живые вакцины, в том числе против особо опасных инфекций, обладают остаточной вирулентностью. При изучении па-

томорфологических изменений, вызванных аттенуированными и авирулентными штаммами возбудителей, прослеживается определенное сходство с морфологическими изменениями при экспериментальном инфекционном процессе. Учитывая ключевую роль свободнорадикального окисления в реализации патогенных свойств возбудителей, можно предположить, что реактогенные свойства живых вакцин обусловлены аналогичными механизмами [23]. Как было сказано выше, низкий потенциал компенсаторных ресурсов организма может привести к иммуносупрессии. Вероятно, при разработке способов метаболической коррекции инфекционных и вакцинальных процессов могут быть использованы общие принципы. Выше было отмечено, что одним из корректирующих методов неспецифических метаболических и функциональных патологий является привнесение в вакцинальный или инфекционный процесс соединений, обладающих способностью повышать антиоксидантный потенциал макроорганизма. К таким соединениям относятся препараты, содержащие селен [24].

Эндогенные функциональные селензависимые молекулы

В настоящее время сформировано представление о том, что биологические эффекты Se в основном реализуются благодаря его включению в селенопротеины, которые в свою очередь участвуют в процессах активации, пролиферации и дифференцировки иммунных клеток. Предполагают, что биодоступный Se, поступающий в организм, преобразуется в селеноводород, затем селенофосфат $\text{H}_2\text{SePO}_3^-$, служащий донором активного Se для Sec-синтазы (SecS). Субстратом для SecS фосфорилированный промежуточный продукт $\text{PSer-tPHK}^{[\text{Ser}]_{\text{Sec}}}$. Продукт SecS $\text{Sec-tPHK}^{[\text{Ser}]_{\text{Sec}}}$ вовлекается в синтез селенопротеинов при помощи SECIS элементов. Семейство селенопротеинов обладает широким диапазоном функций и распределено по всем органам и тканям организма [24, 35, 36].

У людей идентифицировано 25 селенопротеинов, 24 из которых идентичны селенопротеинам грызунов [37], в связи с чем грызуны представляют интерес в качестве модели для изучения роли селенопротеинов в иммунных реакциях.

Изучены и охарактеризованы связанные с функционированием иммунной системы селензависимые ферменты глутатионпероксидазы (GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX6). Эта группа селенопротеинов

совместно с восстановленным глутатионом (GSH) является частью естественной внутренней защиты организма от АФК [38]. Строгая зависимость функционирования глутатионпероксидаз от GSH характерна не для всех изоферментов этого семейства. GPX1 наряду с GSH в качестве тиолового косубстрата может использовать гамма-глутамилцистеин [39]. Se включен в активные центры глутатионпероксидаз и участвует в каталитическом разрушении АФК (O_2^- , H_2O_2) и гидропероксида фосфолипидов. GPX1 и GPX4 являются одними из самых распространенных селенопротеинов в клетках и тканях иммунной системы. Дисульфидную связь окисленного глутатиона (GSSG) до его сульфгидрильной формы GSH восстанавливает глутатионредуктаза [40].

Еще одно охарактеризованное подсемейство селенопротеинов – тиоредоксинредуктазы (TXNRD1, TXNRD2, TXNRD3), восстанавливающие тиоредоксин (TXN) (небольшой активный окислительно-восстановительный белок). Система TXN/TXNRD представляет собой один из значимых механизмов регуляции окислительно-восстановительного статуса клеток [41]. Наиболее распространенная тиоредоксинредуктаза в макрофагах мышей является TXNRD1, где она участвует в инактивации АФК. Экспрессия этого селенопротеина индуцируется липополисахаридом (ЛПС) [42].

Семейство Se-зависимых ферментов йодтиронин-дейодиназ (DIO1, DIO2, DIO3) играет ключевую роль в регуляции активности гормонов щитовидной железы. Они катализируют удаление остатка йода из молекулы тироксина (T4), продуцируя активную (T3) или неактивную (реверсивный T3) форму трийодтиронина [43].

Метионин-R-сульфоксидредуктазы B1 (селенопротеин MSRB1) MSRB1 (человеческая), MSRB1 (мышьяная), SELR (плодовая мушка) и др. совместно со своими антагонистами монооксигеназными доменами MICAL1 и MICAL2 осуществляют разборку и сборку актина, соответственно. При помощи MICAL1 и MICAL2 остатка метионина в актине специфически превращаются в метионин-R-сульфоксид 2 и восстанавливаются обратно до метионина с помощью селенопротеина MSRB1. Макрофаги, стимулируя экспрессию и активность MSRB1 используют этот окислительно-восстановительный механизм в процессе клеточной активации как часть врожденного иммунитета (F-актин участвует в таких динамических процессах, как движение клетки, фагоцитоз, мышечное сокращение и др.) [44].

Селенопротеин F (SELENOF) является резидентным белком (резидентная тиоредоксиноподобная оксидоредуктаза) эндоплазматической сети (ER). Он содержит в активном центре селеноцистеин и функционирует как тиолдисульфидная изомераза, участвующая в образовании дисульфидных связей ER и может быть функционально связан со свертыванием гликопротеина, но эта его функция до конца не понятна [45].

Селенопротеин H (SELENOH) функционирует как оксидоредуктаза, и как было показано, защищает нейроны от повреждения путем ингибирования апоптоза клеток, а также стимулирует митохондриальный биогенез и функцию митохондрий, подавляет клеточное старение посредством поддержания генома и редокс-регуляции. Этот белок является селенопротеином, также содержащим редкую аминокислоту селеноцистеин (SeC) в своем каталитическом центре [46]. Некоторые авторы предполагают, что SELENOH участвует не только в окислительно-восстановительной регуляции, а также в онкогенезе, являясь ключевым регулятором клеточного цикла (предотвращают неконтролируемую пролиферацию) [49].

Селенопротеин I (SELENOI) – трансмембранный белок, принадлежит к семейству этаноламинфосфатидилтрансфераз. Он участвует в биосинтезе фосфолипидов, катализируя образованием фосфатидилэтаноламина, который в свою очередь участвует в формировании и поддержании везикулярных мембран, регуляции липидного обмена и сворачивании белков. Этот белок представляет собой селенопротеин, содержащий SeC в своем каталитическом центре [50].

Селенопротеин K (SELENOK) – трансмембранный белок, локализованный в ER, который участвует в транспорте Ca^{2+} в иммунных клетках. Играет важную роль в пролиферации Т-лимфоцитов, а также миграции Т-клеток и нейтрофилов. SELENOK участвует в деградации растворимых гликозилированных белков ER, также необходим для ковалентного присоединения жирных кислот и экспрессии CD36 Т-клеток. SELENOK принимает участие в поглощении макрофагами липопротеинов низкой плотности. Необходим для стабильности функции белка гетеротетрамера ITPR1, обеспечивающего высвобождение Са из ER, а также играет важную роль в защите клеток от апоптоза, вызванного стрессом [51].

Селенопротеин M, кодируемый SELENOM, SELM, SEPMSEP15 – тиоредоксин-подобный ER-резидентный белок. Функция этого белка

мало изучена. Он локализован в перинуклеарной области, активно экспрессируется в мозге и может быть вовлечен в нейродегенеративные нарушения. Трансгенные мыши с целенаправленной делецией этого гена значительно прибавляют в весе, что указывает на роль этого гена в регуляции массы тела и энергетического обмена. Этот белок представляет собой селенопротеин, содержащий аминокислоту SeC. Появляются сведения об участии селенопротеина M в онкогенезе [52].

Селенопротеин N (SELENON, SELN) – трансмембранный белок, локализован в ER. Играет важную роль в защите клеток от окислительного стресса и регуляции гомеостаза кальция, необходимого для нормального мышечного развития. Мутации гена SELN приводят к миопатиям [53].

Селенопротеин O (SELENOO, SELO) – митохондриальный белок, выполняющий окислительно-восстановительную функцию [54].

Селенопротеин P (SELENOP, SELP) секретируется в плазму для транспорта Se в ткани [24].

Селенопротеин S (SELENOS, SELS) участвует в процессе деградации белков просвета ER, а также в переносе неправильно свернутых белков из ER в цитозоль, где они разрушаются протеосомой [55].

Селенопротеин T (SELENOT, SELT) содержит SeC и обладает активностью, подобной тиреодоксинредуктазной. Показана роль SELT в передаче сигнала аденилатциклазы (цАМФ) в гипофизе. Сверхэкспрессия SELT индуцирует увеличение концентрации Ca^{2+} в клетке [56].

Очевидно, что селенопротеины выполняют разнообразные биологические функции, большинство из которых связаны с регуляцией окислительно-восстановительных процессов. Физиологическая роль многих селенопротеинов детально не изучена, однако очевидно, что функционирование практически всех систем организма зависит от статуса Se.

Синтетические органические соединения селена, имитирующие каталитическую активность селенопротеинов

Реализация биологических эффектов производных Se с аминокислотами, обусловлены их включением в каталитические центры селенопротеинов [24, 35, 36]. Многие соединения характеризуются узким диапазоном между дефицитными и токсичными дозами,

что в значительной степени ограничивает их практическое применение. Поэтому создание новых органических производных Se и изучение биологической активности является весьма важной задачей, особенно из-за их способности имитировать активность природных функциональных молекул, обладающих важными биологическими свойствами (антиоксидантными, противоопухолевыми, противовоспалительными и иммуностропными).

Эбселен (2-фенил-1,2-бензизоселеназол-3(2H)-он) и его производные являются одними из первых хорошо изученных синтетических органических соединений Se, свойства которых были исследованы [57]. Это гетероциклическое соединение обладает противовоспалительными, антиатеросклеротическими и цитопротекторными свойствами, имитируя каталитическую активность глутатионпероксидазы (GPx). Фермент GPx, как часть сложной системы метаболической детоксикации, играет ключевую роль в восстановлении пероксидов и их побочных продуктов до воды и спиртов. Механизмы реакции фермента глутатионпероксидазы и эбселена с тиолами, пероксидами идентичны.

Эбселен обратимо взаимодействует с тиолами без образования селеноводорода, поэтому является менее токсичным соединением. Благодаря этим свойствам эбселен используют в качестве стандарта для сравнения с экспериментальными органоселеновыми препаратами с точки зрения GPx подобной активности. Предварительные исследования показали, что эбселен также ингибирует активность протеаз SARS-CoV-2 [58]. Авторы полагают, что препарат ингибирует вирусные протеазы за счет образования ковалентной связи с тиоловой группой цистеина в их активном центре [58]. Эбселен обладает широким спектром биологической активности. Однако, плохая растворимость в воде затрудняет практическое применение препарата. Для улучшения растворимости и активности эбселена, многие исследования были сосредоточены на получении его производных [59].

Селенопиран (9-фенил-сим-нонагидро-10-селенаантрацен) так же, как эбселен, обладает самостоятельной GPx подобной функциональной активностью. Кроме того, он способен включаться в метаболизм с последующим постепенным высвобождением Se, поэтому этот препарат рассматривают еще и как пролонгированную форму селена [60].

4,4-ди-[3-(5-метилпиразо-лил)]селенид (ДМДПС, Селекор, Селедант) относится к малотоксичным органическим соединениям селена. При введении этого препарата снижается уровень одного из продуктов перекисного окисления липидов малонового диальдегида (МДА) в крови. Выявлены иммуномодулирующее и нейропротекторный эффекты препарата. Однако, пути метаболизма ДМДПС изучены слабо [60].

Разработка новых и доступных методов синтеза селеноорганических соединений позволила перейти к применению эффективных и малотоксичных селеноорганических препаратов [61, 62]. Новый ранее не известный экспериментальный селеноорганический препарат – 2,6-дипиридиний-9-селенабицикло[3.3.1]нонан дибромид (974zh), синтезированный в институте химии имени Фаворского СО РАН, снижал патологическую реакцию в органах экспериментальных животных в ответ на введение живых туляреминой и бруцеллезной вакцин, которые, как известно, обладают высокой реактогенностью [23]. Препарат 974zh также индуцировал снижение соотношения цАМФ/цГМФ в тимусе и селезенке экспериментальных животных, что свидетельствует о повышении пролиферативного потенциала органов [63]. Более того, показано, что исследуемый препарат способен повышать иммунный ответ и протективные свойства макроорганизма на введение вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV, в том числе, при снижении на порядок иммунизирующей дозы (от 10^4 до 10^3 м.к.). Исследуемый препарат не проявлял токсичность в дозе 5 мг/кг живой массы [64]. Низкая токсичность препарата 974zh также, как и других малотоксичных препаратов селена (селенопирана, эбселена и диметилдипиразолилселенида), очевидно обусловлена его низкой биосовместимостью. Механизм действия соединения 974zh пока не известен.

Таким образом, регуляция иммуногенеза и патогенеза, в том числе вакцинального, может быть опосредована биологической активностью экзогенных низкомолекулярных синтетических селеноорганических соединений, способных имитировать каталитическую активность селенопротеинов.

Проведенный в настоящей работе анализ сведений о роли биологической активности Se, свидетельствуют о том, что селензависимые эндогенные молекулы (селенопротеины) играют ключевую роль

в регуляции метаболических и иммунных процессов и поддержании гомеостаза.

Вместе с тем современные исследования показывают, что Se может проявлять свои биологические эффекты не только в каталитических центрах селензависимых ферментов, но также в составе экзогенных низкомолекулярных органических производных, способных имитировать каталитическую активность селенопротеинов, и таким образом, модулировать вакцинальный иммуногенез и патогенез.

Сведения о биологической активности и механизмах действия новых синтетических малотоксичных органических соединений селена могут послужить основой для поиска неспецифических средств метаболической и иммунной коррекции вакцинальных процессов, вызванных живыми аттенуированными вакцинами против особо опасных инфекций.

ГЛАВА 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ

2.1. Влияние экспериментального препарата 974zh на индекс соотношения цАМФ/цГМФ в тимусе и селезенке белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *Y. pestis* EV

Регуляция иммуногенеза так же, как других физиологических процессов, находится под контролем нейроэндокринной системы. Ключевую роль в передаче и амплификации сигналов гормонов и нейромедиаторов играют циклические нуклеотиды. Циклические аденозин-3', 5'-монофосфат (цАМФ) и гуанозин-3', 5'-монофосфат (цГМФ) являются одними из наиболее изученных вторичных внутриклеточных посредников. цАМФ и цГМФ часто оказывают противоположное действие на многие клеточные процессы. Накопление цГМФ в иммунокомпетентных органах обычно связывают с пролиферацией, а повышение концентрации цАМФ с дифференцировкой иммунных клеток. Величина соотношения концентраций цАМФ и цГМФ в клетках и органах иммунной системы предложена в арсенал показателей для оценки иммунного статуса макроорганизма [65].

По мере накопления сведений о механизмах иммуногенеза, а также формирования представлений об уникальности каждого отдельного вакцинального процесса появилось понятие «иммунологические адъюванты». По существу, эти вещества представляют собой иммуностропные субстанции или соединения природного или синтетического происхождения. Привнесение в вакцинальный процесс дополнительных факторов, способных влиять на отдельные звенья иммуногенеза позволит уменьшить дозу живой вакцины, и, таким образом, снизить ее реактогенность.

Исследование проводили на 100 сертифицированных беспородных белых мышах обоего пола массой 18–20 грамм. В эксперименте по определению концентраций цАМФ и цГМФ в клетках макроорганизма животные были разделены на 2 опытных и одну контрольную группы (по 10 особей в группе). Мышей I опытной группы иммунизировали препаратом 974zh однократно подкожно в область правого бедра в объеме 0,5 мл в дозе 2,5 мг/кг. Белым мышам II опытной группы препарат вводили в той же дозе, но двукратно на 1 и 7 сутки. Контрольной группе животных вводили 0,5 мл изотонического раствора NaCl.

Концентрацию цАМФ и цГМФ определяли в гомогенатах тимуса и селезенки (на 14 сутки после иммунизации) при помощи набора для конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) компании «R&D Systems, a Bio-Techne brand» (США).

Для изучения влияния сочетанного применения *Y. pestis* EV с 974zh на резистентность организма к возбудителю чумы животных делили на 6 опытных групп по 10 животных в каждой. I группу иммунизировали подкожно в область бедра *Y. pestis* EV – 10^4 микробных клеток (м.к.), II – 10^3 м.к., III – 974zh однократно (1) на 14 сутки, IV – 974zh двукратно (2) на 1 и 14 сутки, V – *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ + 974zh (1), VI – *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ + 974zh (2). В качестве контроля использовали 10 мышей, получивших 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Доза препарата 974zh во всех вариантах составляла 2,5 мг/кг. Через 21 сутки после иммунизации животных инфицировали штаммом *Y. pestis* 3560 (летальная доза LD_{50} – 4 КОЕ). Наблюдение проводили на протяжении 21 суток. По окончании эксперимента рассчитывали среднюю продолжительность жизни инфицированных животных и процент выживших животных (ПВЖ).

Установлено снижение индекса соотношения (ИС) цАМФ/цГМФ как в тимусе, так и в селезенке (рис. 1). Особенно существенно этот эффект проявился в тимусе, где определено трехкратное уменьшение исследуемого показателя ($p < 0,01$). В селезенке животных, иммунизированных препаратом 974zh двукратно, ИС цАМФ/цГМФ был статистически значимо ниже ($p < 0,05$), чем в селезенке однократно иммунизированных животных. В тимусе статистически значимых различий между первой и второй опытной группой по величине ИС

цАМФ/цГМФ не обнаружено. Вероятно, двукратная иммунизация препаратом 974zh приводила к изменению соотношения цАМФ/цГМФ только в селезенке.

На основании точки зрения о том, что снижение величины соотношения цАМФ/цГМФ связано с увеличением пролиферативного потенциала клеток макроорганизма, можно предположить, что исследуемый препарат стимулирует пролиферативную активность иммунокомпетентных органов. В связи с этим, можно предположить, что селеноорганическое соединение 974zh обладает иммунотропной активностью.

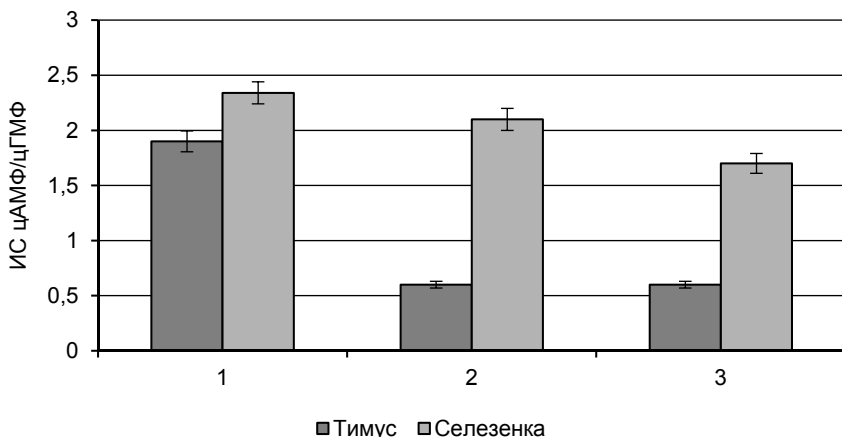


Рис. 1. Индекс соотношения цАМФ/цГМФ в тимусе и селезенке мышей, иммунизированных селеноорганическим соединением 974zh. 1 – контроль; 2 – 974zh (1); 3 – 974zh (2); * – $p < 0,05$ – в сравнении с контролем

В настоящем исследовании проведена оценка действия препарата 974zh на иммуногенные свойства штамма *Y. pestis* EV (рис. 2). В группе мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV в дозе 10^4 КОЕ, определена самая высокая продолжительность жизни – 18,5 сут ($p < 0,01$). В группе мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ, статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой не установлено (рис. 2).

Экспериментальный препарат 974zh сам по себе не оказывал влияние на резистентность организма белых мышей как при одно-

кратном (14 сутки), так и при двукратном введении (1 и 14 сутки). Продолжительность жизни в группе животных, иммунизированных *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ и препаратом 974zh, введенным однократно на 14 сутки, статистически значимо ($p < 0,05$) превышала контрольное значение (рис. 4). В группе животных, иммунизированных *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ и препаратом 974zh двукратно (на 1 и 14 сутки после введения *Y. pestis* EV), исследуемый показатель превышал контрольное значение почти в 2 раза ($p < 0,05$). Кроме того, ПВЖ в этой экспериментальной группе составлял 50 %, что в 1,7 раз больше, чем в случае применения *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ.

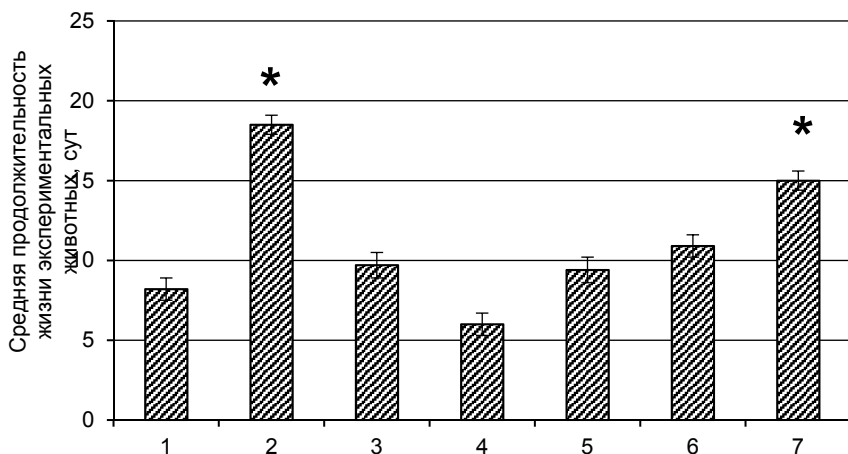


Рис. 2. Влияние селенорганического соединения 974zh на иммуногенные свойства штамма *Y. pestis* EV. 1 – контроль; 2 – *Y. pestis* EV 10^4 КОЕ; 3 – *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ; 4 – 974zh (1); 5 – 974zh (2); 6 – *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ + 974zh (1); 7 – *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ + 974zh (2); * – $p < 0,05$ – в сравнении с контролем

На основании полученных данных можно предположить, что экспериментальный синтетический селеноорганический препарат 974zh влияет на систему сигнальной трансдукции циклических нуклеотидов, обладает иммуностропными свойствами и способен повышать иммунный ответ макроорганизма на введение *Y. pestis* EV, в том числе и при снижении иммунизирующей дозы вакцинного штамма до 10^3 КОЕ.

Следует отметить, что участие селена в иммунных процессах хорошо известно. Селенсодержащие соединения индуцируют

усиление пролиферации Т-клеток, повышение цитотоксичности, опосредованной лимфоцитами, и активность естественных клеток-киллеров и др. [66, 67]. Однако свободный селен характеризуется узким диапазоном безопасности между дефицитными и токсичными дозами, и по этой причине изучение биологической активности его органических производных является весьма важной задачей [68]. Учитывая тот факт, что в данном эксперименте показана способность препарата 974zh потенцировать иммунные реакции макроорганизма в ответ на введение вакцинного штамма *Y. pestis* EV, повышая его эффективность при одновременном снижении иммунизирующей дозы и уменьшении побочного действия, тем не менее, необходимость более детального исследования свойств этого соединения и механизма его действия на иммунную систему не вызывает сомнения.

2.2. Структурная перестройка органов белых мышей, вакцинированных *Y. pestis* EV в сочетании с селенорганическим соединением 974zh

Экспериментальной моделью в опытах служили 70 сертифицированных беспородных белых мышей, стандартных по условиям содержания, возрасту и массе (16–18 г), полученные из питомника ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (РД 42-26-3...3738, НПО «Вектор», Новосибирск). Экспериментальные животные были разделены на три опытные (по 20 особей) и одну контрольную (10 особей) группы. Животных иммунизировали подкожно во внутреннюю поверхность левого бедра: I-й группе вводили ЕД₅₀ *Y. pestis* EV (10⁴ КОЕ), II-й группе – селенорганическое соединение 974zh (2,5 мг/кг), III-й группе – ЕД₅₀ *Y. pestis* EV и препарат 974zh (2,5 мг/кг). Контролем служили интактные белые мыши. Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 суток.

Животных выводили из эксперимента под наркозом на 3, 7, 14 и 21 сутки с момента иммунизации. Анатомический материал (лимфатические узлы, селезенка, тимус, надпочечники, печень) для гистологического исследования фиксировали в 10% водном растворе формалина (рН 7,0–7,2), обезвоживали в спиртах с возрастающей концентрацией, заливали в парафин. Полутонкие срезы окрашивали

общепринятыми методиками (гематоксилин и эозин), плазматические клетки выявляли по методу Браше. Количественную морфометрию объемных долей коркового и мозгового вещества тимуса, лимфатического узла, надпочечников, а также белой и красной пульпы селезенки проводили с использованием автоматического анализа изображения (при увеличении окуляра – 10, объектива – 10, световой микроскоп «Zeiss», Германия) с помощью видеокамеры «Ахиосам Исс3» разрешение $2080 \times 1540 = 3.3$ Мпикс и компьютерной программы «MoticImagesPlus» (версия 2). Подсчет числа плазматических клеток проводили с помощью программы «ВидеоТест-Морфология», версия 4 (Санкт-Петербург).

Установлено, что на 7 сутки исследования в тимусе животных, иммунизированных *Y. pestis* EV имеет место статистически значимое снижение доли коркового вещества в 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Начиная с 14 суток, доля коркового вещества тимуса возрастает и к 21 суткам показатель незначительно превышает контрольные значения (рис. 3). В мозговом веществе тимуса животных I группы с 3 по 14 сутки выявлено достоверно значимое увеличение количества бластных клеток в 1,5 и 1,8 раза соответственно по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Установлено, что у мышей II группы в ранние сроки исследования (3 сутки) доля коркового вещества тимуса соответствовала значению в контроле ($p < 0,05$). Это может быть связано с антиоксидантным действием селенсодержащего соединения и повышением устойчивости организма к стрессовым факторам, которым является *Y. pestis* EV. Начиная с 7 суток, объем коркового вещества увеличивается и достигает максимального значения к 14–21 суткам ($59,2 \pm 1,5$ % и $58,9 \pm 1,2$ % соответственно), превышая показатели в контрольной группе на 10,2 % и 8,8 % ($p < 0,05$) (рис. 3).

Можно предположить, что препарат 974zh, обладающий иммунотропными свойствами, стимулирует иммунный ответ, сокращая сроки латентного периода. С 3 по 14 сутки в корковом веществе тимуса экспериментальных животных II группы наблюдается достоверное увеличение количества бластных клеток и лимфоцитов в 1,3–2,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с I группой. К 21 суткам эти показатели незначительно снижаются, но превышают значения в контрольной группе.

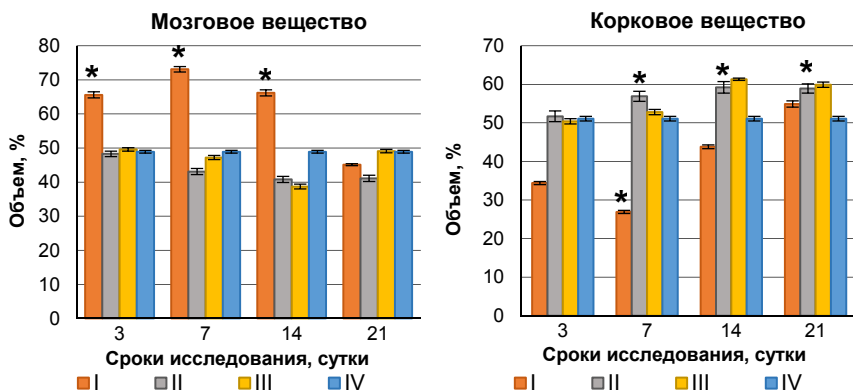


Рис. 3. Соотношение объемных долей коркового и мозгового вещества тимуса экспериментальных животных ($M \pm SD$, %). I – *Y. pestis* EV; II – *Y. pestis* EV + 974 zh; III – 974zh; IV – контроль; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Установлено, что на 7 сутки в лимфатических узлах животных I группы увеличение объемной доли коркового вещества (32,1 % – в контроле, в опыте – 47,2 %) в 1,5 раза ($p < 0,05$) превышает значение в контроле (рисунок 4). Увеличение произошло за счет гиперплазии фолликулов, вызванное усиленной стимуляцией В-лимфоцитов к бласттрансформации в герминативном центре лимфатического узла. К 14–21 суткам данные показатели снижаются, но остаются выше контрольных. Доля паракортикальной зоны лимфатических узлов белых мышей во все сроки исследования не отличалась от показателей в контроле. На 7 сутки отмечается повышение бластных клеток в реактивных центрах в 3,4 раза ($p < 0,05$) и макрофагов в 2,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

У животных, иммунизированных экспериментальным селен-содержащим соединением 974zh, в регионарном лимфатическом узле на 7–14 сутки исследования имело место незначительное увеличение коркового вещества в 1,2–1,3 ($p < 0,05$) раза по сравнению с контролем.

В кортикальной зоне лимфатических узлов животных II группы на 3 сутки отмечается увеличение макрофагов в 3,9 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и в 1,4 раза – I группе. Максимальное увеличение объема доли коркового вещества в лимфатических узлах белых мышей как привитых *Y. pestis* EV, так и *Y. pestis* EV в сочета-

нии с 974zh, приходится на 7 сутки (рис. 4) исследования и составляет $47,2 \pm 0,8 \%$ и $52,8 \pm 0,9 \%$, что в 1,5 и 1,6 раза соответственно ($p < 0,05$) превышает контрольные значения. К 21 суткам объемная доля коркового вещества снижается, оставаясь значительно выше показателей в контроле. Доля паракортикальной зоны, которая является Т-зависимой зоной, на 7–14 сутки исследования увеличена на 2,0–2,5 % ($p < 0,05$) соответственно, по сравнению с контрольными значениями и на 1,5–1,6 % ($p < 0,05$) по сравнению с показателями I группы. Это свидетельствует об усилении антиген-зависимой дифференцировки и пролиферации Т-лимфоцитов.

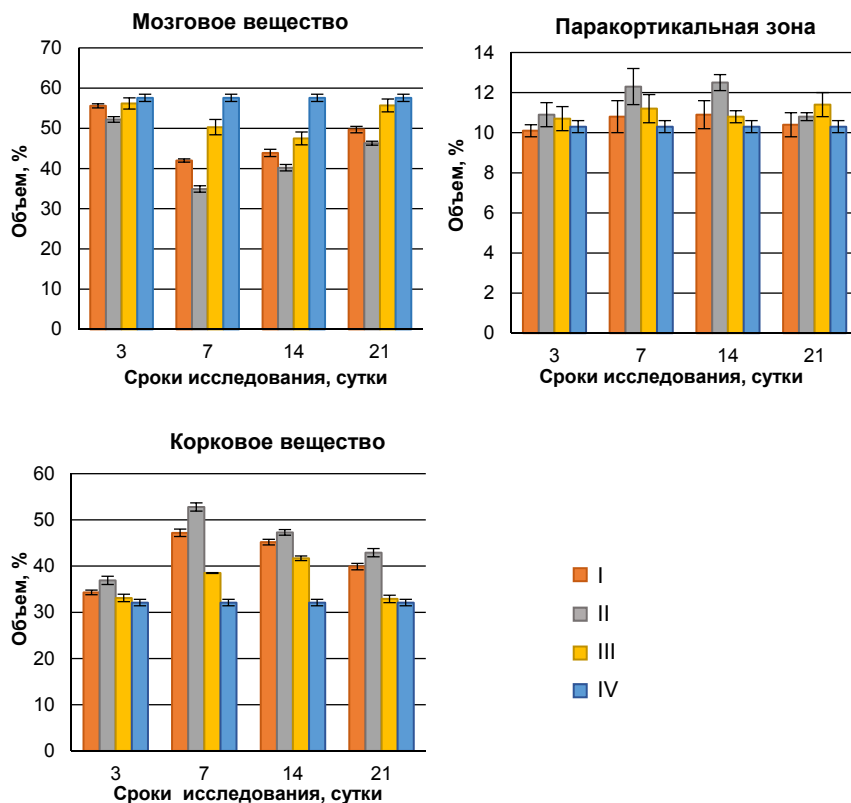


Рис. 4. Соотношение коркового и мозгового вещества лимфатических узлов экспериментальных животных ($M \pm SD$, %). I – *Y. pestis* EV; II – *Y. pestis* EV + 974zh; III – 974zh; IV – контроль; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В группе животных, иммунизированных *Y. pestis* EV, в мозговых тяжах лимфатических узлов, начиная с 3 суток исследования, появляются проплазмциты и плазмциты, их максимальное количество приходится на 7 сутки и составляет $20,9 \pm 0,6$ %, превышая показатели контрольной группы ($0,35 \pm 0,07$ %) в 59,6 раз ($p < 0,05$), что свидетельствует об иммунной перестройке органа в ответ на антигенную стимуляцию. К 21 суткам количество плазмцитов статистически значимо снижается до $6,94 \pm 0,53$ %, но превышает контрольные значения в 18,3 ($p < 0,01$) раза (рис. 5).

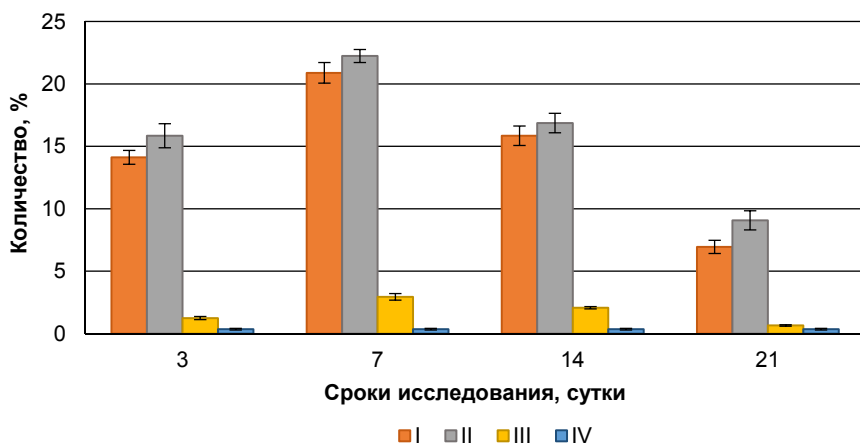


Рис. 5. Показатели содержания плазматических клеток в мозговых тяжах регионарных лимфатических узлов экспериментальных животных, вакцинированных *Y. pestis* EV ($M \pm SD$, %). I – *Y. pestis* EV; II – *Y. pestis* EV + 974zh; III – 974zh; IV – контроль; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

У животных, иммунизированных *Y. pestis* EV в сочетании с 974zh по сравнению с I группой, на 3–7 сутки отмечено увеличение содержания макрофагов и плазматических клеток в 1,2 раза ($p < 0,05$). Максимальное их значение приходится на 7 сутки и составляет $22,4 \pm 0,83$ % ($p < 0,05$) с последующим снижением к 21 суткам до $9,07 \pm 0,53$ %.

В реактивных центрах регионарных лимфатических узлов на 3–7 сутки имеет место заметное увеличение бластных клеток в 4,2–4,0 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В мозговых тяжах, установлен-

но достоверное увеличение плазматических клеток. Максимальное их количество приходится на 7 сутки (рис. 6а) и превышает показатели в I опытной группе (рис. 6б) на 3,9 % ($p < 0,05$), постепенно снижается к 21 суткам до $9,1 \pm 0,5$ %, оставаясь при этом значительно выше, чем в контроле ($0,4 \pm 0,1$ %).

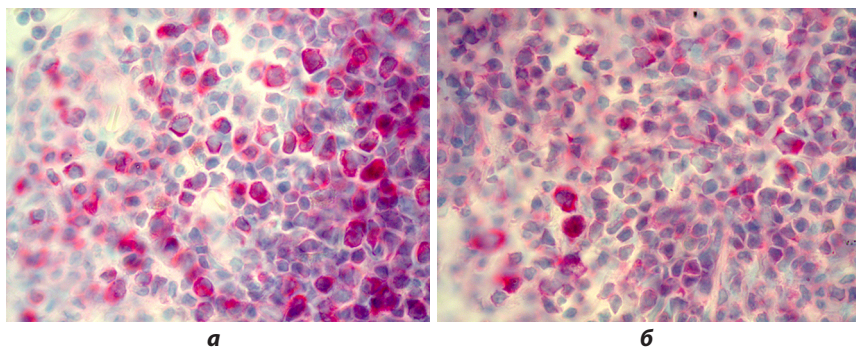


Рис. 6. Микрофотография лимфатического узла белой мыши. **а** – *Y. pestis* EV + 974zh (7 сутки). Проплиферация плазмоцитов и плазмобластов; **б** – *Y. pestis* EV (7 сутки). Увеличение плазматических клеток. Окраска по Браше. Ок. – 10, об. – 40

В селезенке на 7 сутки у животных I опытной группы установлено увеличение доли белой пульпы на 9,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что может быть связано с гиперплазией фолликулов за счет выраженного просветления реактивных центров. Доля которых по отношению к общей площади фолликула за счет пролиферации молодых форм клеток на 7 сутки составила 13,5 %, что в 2,5 раза ($p < 0,05$) больше по сравнению с контрольной группой животных (табл. 1).

Расширение периартериальной зоны лимфоидного фолликула на 7–14 сутки превышало контрольные значения в 1,3–1,7 раза ($p < 0,05$) соответственно, за счет малодифференцированных бластов. В эти сроки исследования также отмечалось достоверное увеличение доли мантийной зоны лимфоидного фолликула селезенки, ее показатели составили 42,1–45,1 %, что в 1,3–1,4 раза ($p < 0,05$) превышает контрольные значения.

Таблица 1

Соотношение объемных долей красной и белой пульпы селезенки
экспериментальных животных ($M \pm SD$, %)

Антиген	Структурный компонент	Сроки, сутки			
		3	7	14	21
<i>Y. pestis</i> EV	КП	67,1 $\pm$ 0,9	59,8 $\pm$ 0,6	63,2 $\pm$ 0,9	69,9 $\pm$ 0,8
	БП	32,9 $\pm$ 0,8	40,2 $\pm$ 0,5*	36,8 $\pm$ 0,7	30,1 $\pm$ 0,5
<i>Y. pestis</i> EV + 974zh	КП	66,8 $\pm$ 0,7	57,1 $\pm$ 0,6	59,8 $\pm$ 0,8	68,4 $\pm$ 0,5
	БП	33,2 $\pm$ 0,4	42,9 $\pm$ 0,9*	40,2 $\pm$ 0,6*	30,8 $\pm$ 0,4
974zh	КП	69,1 $\pm$ 0,9	68,7 $\pm$ 0,7	69,2 $\pm$ 0,5	69,4 $\pm$ 0,7
	БП	30,9 $\pm$ 0,4	31,3 $\pm$ 0,9*	30,8 $\pm$ 0,8	30,6 $\pm$ 0,4
Контроль	КП	69,6 $\pm$ 0,6			
	БП	30,4 $\pm$ 0,7			

Примечание. БП – белая пульпа; КП – красная пульпа; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В селезенке белых мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV + 974zh, выявлено увеличение соотношения объемной доли белой пульпы, которое вызвано гиперплазией лимфоидных фолликулов в результате пролиферации бластных клеток в реактивных центрах. Максимальное увеличение белой пульпы селезенки приходится на 7 сутки исследования, которые превышают контрольные значения на 12,5 % и на 2,7 % в I опытной группе ($p < 0,05$). Следует отметить, что к 14 суткам объемная доля белой пульпы в II группе сокращается на 2,7 %, что в 1,3 раза меньше, чем в I группе.

В I группе животных начиная с 3 суток отмечается увеличение количества клеток плазмочитарного ряда, максимальное число которых выявлено на 7-е сутки исследования ($8,61 \pm 0,06$), что 19,4 раза ($p < 0,05$) больше, чем в контрольной группе (рис. 7). К 21 суткам этот показатель снизился, но превосходил значения в IV группе в 8,8 раз ($p < 0,05$).

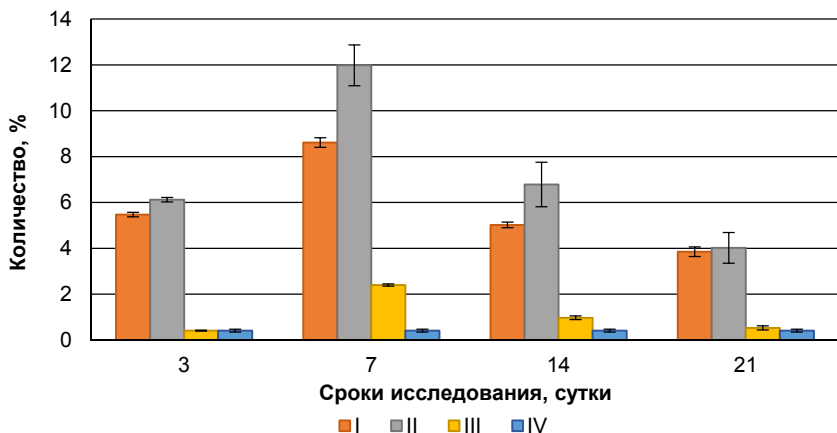


Рис. 7. Доля плазмочитов в селезенке экспериментальных животных ($M \pm SD$, %). I – *Y. pestis* EV; II – *Y. pestis* EV + 974zh; III – 974zh; IV – контроль; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Максимальное число клеток плазмочитарного ряда у мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV + 974zh, приходится на 7 сутки исследования и составляет $11,98 \pm 0,89$, что в 1,4 раза ($p < 0,05$) больше, чем в I опытной группе. К 21 суткам установлено снижение данных показателей, которые были статистически значимо выше, чем в IV группе, но не имели достоверных различий с I группой (*Y. pestis* EV).

У животных, получивших экспериментальный препарат 974zh (III группа), по сравнению с контролем, на 14 сутки отмечено увеличение периартериальной зоны селезенки в 1,2 раза, что связано с повышением числа средних и малых лимфоцитов (в 1,7 раза при $p < 0,05$). Максимальное количество плазматических клеток как в мантийной зоне, так и красной пульпе отмечено к 7 суткам и превосходит значения в контроле в 5,2 ($p < 0,01$) раза.

При гистологическом исследовании в печени на 3–7 сутки после иммунизации *Y. pestis* EV выявлены зернистая дистрофия органа (рис. 8а), полнокровие, в единичных случаях мелкие кровоизлияния и образование субмиллиарных узелков (рис. 8б). В отдельных гепатоцитах ядра подвергнуты лизису, а граница печеночных клеток не везде четкая. Также имеют место очаговая диффузная гиперплазия купферовских клеток и лимфогистиоцитарная инфильтрация клеток вокруг кровеносных сосудов. К 21 суткам данные изменения заметно нивелировались.

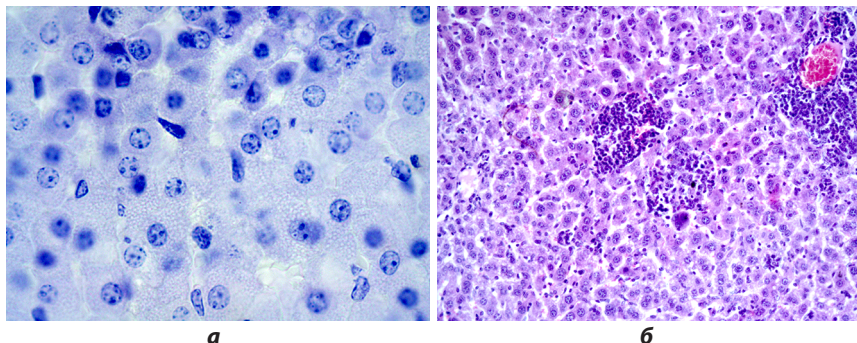


Рис. 8. Печень белой мыши, иммунизированной *Y. pestis* EV (7 суток). **а** – зернистая дистрофия, гиперплазия купферовских клеток. Окраска тионином. Ок. – 10, об. – 100. **б** – полнокровие, инфильтрация клеток вокруг кровеносных сосудов и образование узелков. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. – 10, об. – 20.

При просмотре гистологических срезов печени белых мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV в сочетании с 974zh, существенных изменений не отмечалось. Регистрировалась слабая лимфогистиоцитарная инфильтрация клеток вокруг кровеносных сосудов и небольшая дистрофия (рис. 9).

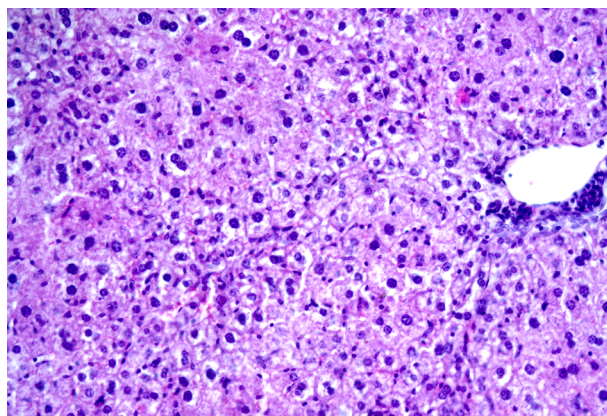


Рис. 9. Печень белой мыши, иммунизированной *Y. pestis* EV + 974zh (7 суток). Небольшая инфильтрация клеток вокруг кровеносных сосудов. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. – 10, об. – 20.

Изменения в печени у животных, получивших экспериментальный препарат 974zh, по сравнению с контролем отсутствовали во все сроки наблюдения.

В надпочечниках белых мышей I группы на 3 сутки исследования установлено увеличение объемной доли коркового и снижение мозгового веществ (табл. 2).

Таблица 2

Соотношение коркового и мозгового слоя надпочечников экспериментальных животных ($M \pm SD$, %)

Антиген	Объемная доля	Сроки, сутки			
		3	7	14	21
<i>Y. pestis</i> EV	KB	79,3 $\pm$ 1,7*	80,1 $\pm$ 1,8*	75,1 $\pm$ 1,4	72,2 $\pm$ 1,8
	MB	20,3 $\pm$ 0,9	19,9 $\pm$ 0,7	24,9 $\pm$ 0,5	27,8 $\pm$ 1,2
<i>Y. pestis</i> EV + 974zh	KB	72,4 $\pm$ 1,4	76,8 $\pm$ 1,5*	73,1 $\pm$ 1,6	71,9 $\pm$ 1,9
	MB	27,6 $\pm$ 0,7	23,2 $\pm$ 0,9	26,9 $\pm$ 0,8	28,1 $\pm$ 1,2
974zh	KB	72,9 $\pm$ 1,8	73,1 $\pm$ 1,7	71,6 $\pm$ 1,8	72,1 $\pm$ 1,6
	MB	27,1 $\pm$ 0,7	26,9 $\pm$ 0,8	28,4 $\pm$ 0,5	27,9 $\pm$ 0,9
Контроль	KB	71,9 $\pm$ 1,6			
	MB	28,1 $\pm$ 0,9			

Примечание. KB – корковое вещество; MB – мозговое вещество; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Толщина коркового слоя составила 79,3 $\pm$ 1,7 %, что выше значений в контроле на 8,5 % ($p < 0,05$). В корковом веществе заметно превалирует объем пучковой зоны на фоне снижения доли клубочковой (9,8 $\pm$ 0,6 %, что ниже контроля на 4,4 % ($p < 0,05$)). Это подтверждает участие надпочечников в системе стрессовых механизмов, оказывающих влияние на углеводный обмен и иммунную систему, а также на воспалительные и аллергические реакции [69].

Максимальные изменения показателей соотношения объемной доли коркового вещества в надпочечниках белых мышей выявлены в группе II на 7 сутки наблюдения (табл. 2). При этом следует заметить, что гиперплазия коркового вещества у животных этой группы значительно ниже (на 3,3 % ($p < 0,05$)), чем I опытной группе, и составляет 76,8 $\pm$ 1,5 %. Увеличение доли коркового вещества в надпочечниках произошло за счет снижения объема клубочковой зоны, которая соста-

вила от объема коркового вещества $12,8 \pm 0,4\%$. Доля объема пучковой зоны – $81,4 \pm 1,2\%$, что выше на $2,2\%$ ($p < 0,05$) значений в группе IV группе и ниже на $3,3\%$ ($p < 0,05$) показателей в I группе (*Y. pestis* EV).

Размер пучковой зоны у животных I опытной группы составил $84,7 \pm 1,6\%$, что превышает значение в контрольной группе на $5,5\%$ ($p < 0,05$). Объем сетчатой зоны на 7 сутки незначительно увеличился и составил $8,5 \pm 0,5\%$ (рис. 10). Следует отметить, что прослеживается отчетливая дифференцировка на зоны, для которых сохранена характерная архитектоника. На границе коркового и мозгового вещества обнаружены макрофаги. Начиная с 14 суток, данные изменения постепенно нивелируются и к 21 суткам достигают контрольных значений.

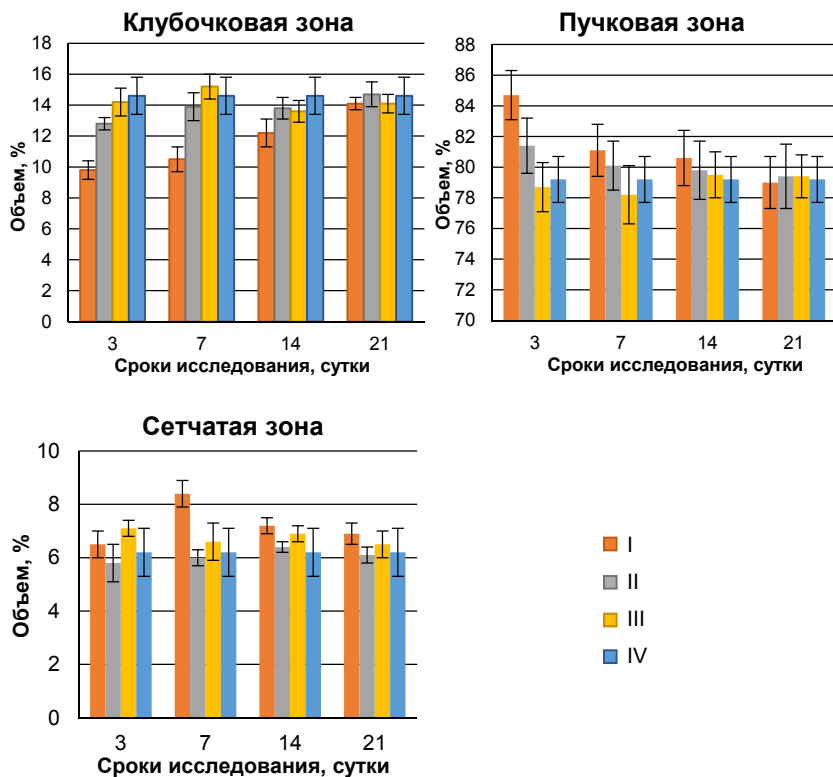


Рис. 10. Соотношение объемных зон коркового вещества надпочечников экспериментальных животных ($M \pm SD$, %). I – *Y. pestis* EV; II – *Y. pestis* EV + 974zh; III – 974zh; IV – контроль; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Важно отметить, что у животных III группы объемные доли надпочечников и процентное соотношение между их структурными зонами (клубочковой, пучковой, сетчатой) во все сроки наблюдения не отличались от контрольных значений.

Сравнительный анализ полученных данных между группами экспериментальных животных показал, что совместное введение вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с препаратом 974zh усиливает морфологические изменения в тимусе за счет увеличения объема коркового вещества и пролиферации лимфоидных клеток. Экспериментальное селенсодержащее соединение вызывает усиленную бласттрансформацию в реактивных центрах фолликулов селезенки и лимфатических узлов белых мышей, что приводит к пролиферации плазматических клеток. У экспериментальных животных, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ совместно с препаратом 974zh, более выражена пролиферация антителообразующих клеток, которая может быть связана с пролонгирующим действием этого соединения на плазмочитарную реакцию.

Сравнительное изучение действия вакцинного штамма и сочетанного применения *Y. pestis* EV НИИЭГ с 974zh выявило различия в реакции иммунной системы биомодели, обусловленные механизмом действия селенсодержащего соединения. Установлено, что препарат 974zh при сочетанном использовании с *Y. pestis* EV НИИЭГ усиливает у экспериментальных животных реакцию со стороны иммунокомпетентных органов, оказывает антидистрофический эффект, способствует активации иммунного ответа и не оказывает повреждающего действия на ткани макроорганизма.

Экспериментальный препарат 974zh при сочетанном применении с *Y. pestis* EV НИИЭГ нивелирует негативные изменения, вызываемые вакцинным штаммом, в печени белых мышей. Сравнительный анализ структурных изменений в надпочечниках при морфометрическом исследовании опытных групп белых мышей указывает на способность препарата 974zh снижать стрессовые воздействия *Y. pestis* EV НИИЭГ на организм экспериментальных животных.

Результаты, полученные в ходе исследования, свидетельствуют о перспективности дальнейшей работы в данном направлении и накопления новых данных о воздействии экспериментального селенсодержащего препарата 974zh на организм экспериментальных животных.

2.3. Влияние синтетического селеноорганического соединения на поствакцинальный иммунопоэз в красном костном мозге и клеточный состав периферической крови белых мышей, вакцинированных *Y. pestis* EV

В данном разделе представлены материалы изучения действия экспериментального синтетического селеноорганического соединения 2,6-дипиридиновой-9-селенабицикло[3.3.1]нонан дибромида (974zh) в сочетании с вакцинным штаммом *Y. pestis* EV на иммунопоэз в красном костном мозге и клеточный состав периферической крови экспериментальных животных.

Исследование выполнено на сертифицированных беспородных белых мышах ($n = 100$) массой 18–20 г, стандартных по условиям содержания. Животные были разделены на четыре опытные и одну контрольную группу (по 20 особей в каждой). Мышам опытных групп вводили вакцинный штамм *Y. pestis* EV однократно подкожно в область правого бедра в объеме 0,5 мл: 1-й группе – 10^4 КОЕ (ИД₅₀), 2-й – 10^3 КОЕ, 3-й – 10^3 КОЕ совместно с препаратом 974zh в дозе 2,5 мг/кг. Животным 4-й группы инъектировали только препарат 974zh (2,5 мг/кг). Мышам контрольной группы вводили 0,5 мл изотонического раствора NaCl pH 7,2. Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 сут.

Кровь у вакцинированных мышей брали прижизненно из хвостовой вены на 3, 7, 14 и 21-е сутки с момента иммунизации. Для приготовления мазков красного костного мозга (ККМ) образцы получали из конечности, извлекая бедренную кость. Приготовленные препараты (мазки крови и ККМ) фиксировали в смеси Никифорова и окрашивали по стандартным методикам [70].

Использовали метод обзорной микроскопии. В мазках, приготовленных из ККМ, оценивали индекс созревания нейтрофилов (ИСН), который выражает отношение молодых нейтрофильных гранулоцитов к зрелым клеткам (промиелоциты + миелоциты + метамиелоциты / палочкоядерные + сегментоядерные нейтрофилы).

Процентное соотношение различных видов лейкоцитов в мазках периферической крови определяли методом цитологического исследования форменных элементов крови. Взаимоотношение гуморального и клеточного иммунитета оценивали по лимфоцитарному индексу и выражали в процентном отношении лимфоцитов к нейтрофилам (миелоциты, метамиелоциты/юные, палочкоядерные, сегментоядерные). Активация

клеточного звена иммунитета на ранних этапах вакцинального процесса сопровождается снижением лимфоцитарного индекса [70].

Степень алергизации в мазках крови определяли по соотношению клеток гранулоцитарного ростка и индекса алергизации, который рассчитывается как отношение суммы процентных значений эозинофилов и базофилов к сумме процентных значений нейтрофилов, метамиелоцитов и миелоцитов [64].

Изображения анализировали с помощью светового микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss) с видеокамерой AxioCam Icc 3 (разрешение $2080 \times 1540 = 3.3$ Мпикс, ок. 100, об. 10) в программе Motic Images Plus 2.0. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программах Statistica 6.0 (StatSoft Inc.) и Microsoft Office Excel 2003 с применением сравнительного анализа по t критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Для оценки поствакцинального иммуногенеза исследовали изменения клеточного состава ККМ и периферической крови экспериментальных животных. При адекватной реакции организма на вакцинацию клеточные процессы развиваются в направлении активации иммунопоэза в ККМ и дальнейшей миграции клеток в кровоток.

У мышей контрольной группы показатели миелограммы и лейкограммы на протяжении всего эксперимента были относительно постоянны. Средний показатель ИСН в ККМ составил $0,58 \pm 0,04$ усл. ед. В периферической крови лимфоцитарный индекс находился в пределах $1,55 \pm 0,12$ усл. ед., индекс алергизации – $0,03 \pm 0,01$ усл. ед. У мышей 4-й группы, получивших инъекцию препарата 974zh, в течение всего эксперимента достоверных изменений в ИСН (рис. 11), лимфоцитарном индексе (рис. 12) и индексе алергизации (рис. 13), а также изменений в лейкоцитарной формуле периферической крови не выявлено. Однако в ККМ имела место незначительная пролиферация клеток гранулоцитарного и лимфоцитарного ростков.

В мазках ККМ мышей 1-й группы, вакцинированных *Y. pestis* EV (10^4 КОЕ), на ранних сроках исследования (3-и сутки) отмечалось увеличение числа зрелых клеток гранулоцитарного ростка, в связи с чем ИСН значительно увеличился и составил $1,10 \pm 0,06$ усл. ед., что превышало контрольные значения в 1,9 раза ($p < 0,05$) (рис. 11). Эти данные свидетельствуют об активации выхода зрелых клеток из костномозгового пула в кровяное русло. Процентное содержание

нейтрофилов в лейкограмме достигало максимального значения на 3-и и 7-е сутки, за счёт этого лимфоцитарный индекс (отношение общего числа лимфоцитов к нейтрофилам) резко снижался и составлял 0,8 и 0,72 усл. ед., что было ниже контрольных значений в 2,0 и 2,2 ($p < 0,05$) раза соответственно (рис. 12).

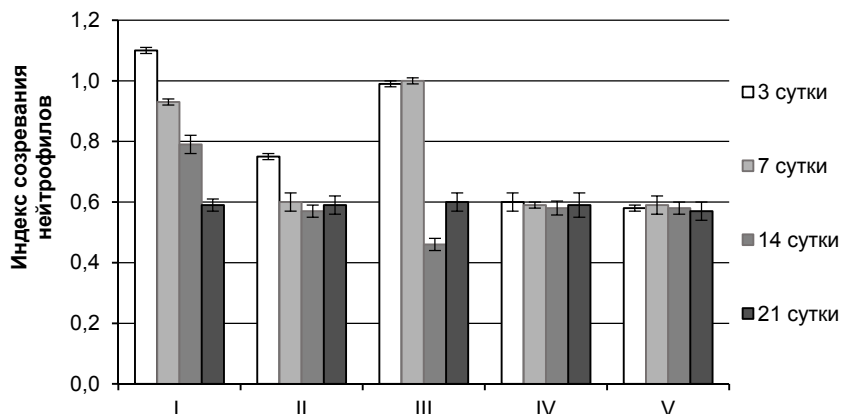


Рис. 11. Индекс созревания нейтрофилов в ККМ белых мышей, вакцинированных *Y. pestis* EV в дозах 10^3 и 10^4 КОЕ отдельно и в сочетании с препаратом 974zh (2,5 мг/кг)

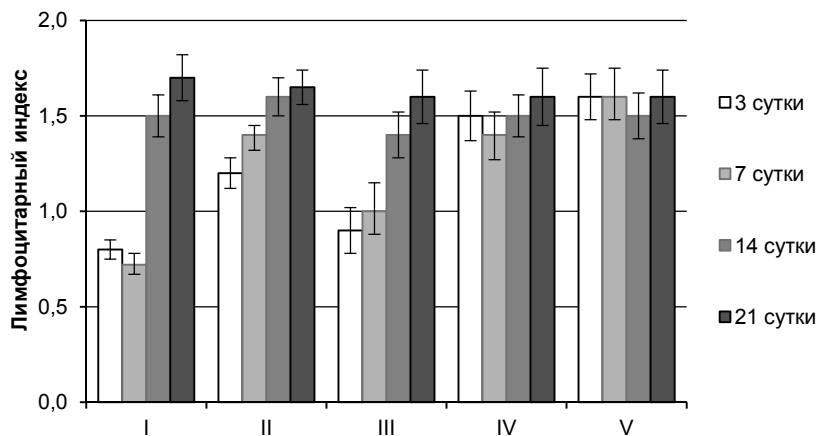


Рис. 12. Лимфоцитарный индекс в периферической крови белых мышей, вакцинированных *Y. pestis* EV в дозах 10^3 и 10^4 КОЕ отдельно и в сочетании с препаратом 974zh (2,5 мг/кг)

В более поздние сроки (14–21-е сутки) значения индекса повышалось до контрольного. У животных, вакцинированных штаммом *Y. pestis* EV в высокой дозе (10^4 КОЕ), на ранних сроках также наблюдалось заметное увеличение количества бластных клеток (5,4 %), в 1,7 ($p < 0,05$) превышающее контрольные значения, а также рост процентного содержания пролимфоцитов с азурофильной зернистостью, которая считается характерной для Т-лимфоцитов. Очевидно, что иммунизация животных *Y. pestis* EV активирует клеточное звено врождённого иммунитета. Вместе с тем количество эозинофилов всех генераций в 1-й группе составило 9,2 %, что в 1,6 раза ($p < 0,05$) больше контрольных значений. За счёт повышения уровня эозинофилов индекс аллергизации в этой группе на 3-и сутки исследования повышался в 1,6 раза ($p < 0,05$; рис. 13). Начиная с 7-х суток количество эозинофилов уменьшалось и к 14-м суткам снижалось до контрольных значений. Повышение индекса аллергизации при вакцинальном процессе, вызванном высокой дозой вакцинного штамма, свидетельствует о том, что *Y. pestis* EV обладает остаточной вирулентностью и в оптимальной дозе вызывает не только иммунные, но и патологические реакции.

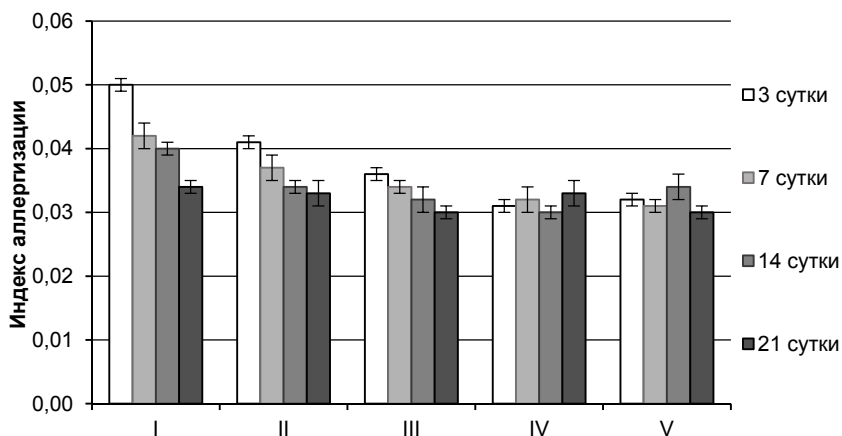


Рис. 13. Индекс аллергизации в периферической крови белых мышей, вакцинированных *Y. pestis* EV в дозах 10^3 и 10^4 КОЕ отдельно и в сочетании с препаратом 974zh (2,5 мг/кг)

Y. pestis EV в дозе 10^3 КОЕ, что на порядок ниже дозы, используемой при вакцинации (10^4 КОЕ), в меньшей степени влияла на индекс алергизации (рис. 13). Показатели миелограммы и лейкограммы (ИСН и лимфоцитарный индекс) во 2-й группе свидетельствуют о том, что активность иммунопоэза у животных не достигала такого высокого уровня, как в 1-й группе (рис. 11, 12). Ранее нами показано, что штамм *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ обладает низкой протективной активностью, которую удалось повысить введением препарата 974zh при вакцинации.

В связи с побочными эффектами живого аттенуированного вакцинного штамма чумного микроба в дозе 10^4 КОЕ и слабой иммуногенностью дозы 10^3 КОЕ большой интерес представляют данные миелограммы и лейкограммы животных, иммунизированных *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ совместно с исследуемым препаратом 974zh. Морфологический анализ миелограммы в 3-й группе показал, что на 3-и и 7-е сутки исследования у животных активизируется отток зрелых клеток из ККМ в кровоток. Значение ИСН в ранние сроки вакцинального процесса составило 0,99 и 1,0 усл. ед., что в 1,7 раза ($p < 0,05$) превосходило контрольные значения. Благодаря совместному введению препарата 974zh с низкой дозой живой противочумной вакцины (10^3 КОЕ) показатель ИСН достигал значений, сопоставимых со значениями ИСН в 1-й группе животных, вакцинированных оптимальной иммунизирующей дозой *Y. pestis* EV 10^4 КОЕ. Кроме того, на 7-е сутки исследуемый показатель в 3-й группе оставался на высоком уровне, тогда как в 1-й группе заметно снижался (рис. 11). К 14-м суткам ИСН (соответственно, и миграция зрелых клеток из костного мозга в кровеносное русло) у животных 3-й группы был ниже контрольного, а к 21-м суткам соответствовал контрольным значениям. На ранних сроках (3-и и 7-е сутки) вакцинального процесса снижался лимфоцитарный индекс. Его значения, как и значения ИСН, были сопоставимы с таковыми у животных, иммунизированных *Y. pestis* EV 10^4 КОЕ (рис. 12). Очевидно, что исследуемый препарат потенцировал клеточное звено иммунного ответа, вызванного низкой дозой вакцинного штамма. Во все сроки исследования в 3-й группе не отмечалось увеличения количества эозинофильных клеток. Снижение аллергической реакции (рис. 13) может быть связано как с противовоспалительными эффектами экспериментального селеноорганического препарата, так и со снижением дозы живой вакцины.

Таким образом, препарат 974zh потенцирует пролиферативную активность иммунных клеток и их миграцию из ККМ в кровоток в ответ на введение *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ, что на порядок ниже оптимальной иммунизирующей дозы (дозы, применяемой на практике). Кроме того, снижение дозы живой противочумной вакцины и противовоспалительные свойства исследуемого препарата могут снизить аллергическую реакцию при вакцинальном процессе.

2.4. Влияние синтетического селеноорганического препарата на степень патоморфологических изменений органов белых мышей, иммунизированных туляремийной и бруцеллезной вакцинами

На следующем этапе наших исследований нами проведена оценка действия препарата 974zh, которую осуществляли в эксперименте на 150 сертифицированных беспородных белых мышах обоих полов массой 18–20 г. Белые мыши были разделены на 4 опытных и одну контрольную группы. В каждой группе было по 30 мышей. Животных 1-й и 2-й опытных групп иммунизировали *B. abortus* 19 ВА (2×10^6 КОЕ/0,5 мл) однократно подкожно в область правого бедра. Животным 3-й и 4-й опытных групп инокулировали вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ (100 КОЕ/0,5 мл). Мыши 2-й и 4-й группы одновременно с культурой микробов получали подкожно в область левого бедра соединение 974zh (2 мг/кг). Контрольной группе в том же объеме вводили изотонический раствор NaCl pH 7,2. За животными наблюдали в течение 21 сут. Мышей выводили из эксперимента под наркозом на 3, 7, 14 и 21-е сутки с момента иммунизации, после чего проводили вскрытие и описывали морфологические изменения в органах и тканях: исследовали место введения, тимус, селезенку, печень, надпочечники, почки, лимфатические узлы.

Степень морфологических изменений органов выражали в условных единицах с применением 3-балльной шкалы [71]. По степени выраженности изменений оценивали следующим образом: 0 – отсутствие изменений; 1 – слабо выраженные изменения; 2 – выраженные изменения; 3 – сильно выраженные изменения.

В группе животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выявленные морфологические изменения органов на 7-е и 14-е сутки

после иммунизации не превышали 0,6 усл. ед. (рис. 14). У животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ и препаратом 974zh, также были выявлены морфологические изменения в органах, однако их уровень на 7-е сутки был в два раза ниже, а на 14-е сутки — в 6 раз ниже, чем в группе без препарата. На 21-е сутки после иммунизации уровень изменений органов животных этой группы приближался к контрольному значению. Очевидно, что препарат 974zh снижал побочные реакции организма животных на введение вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

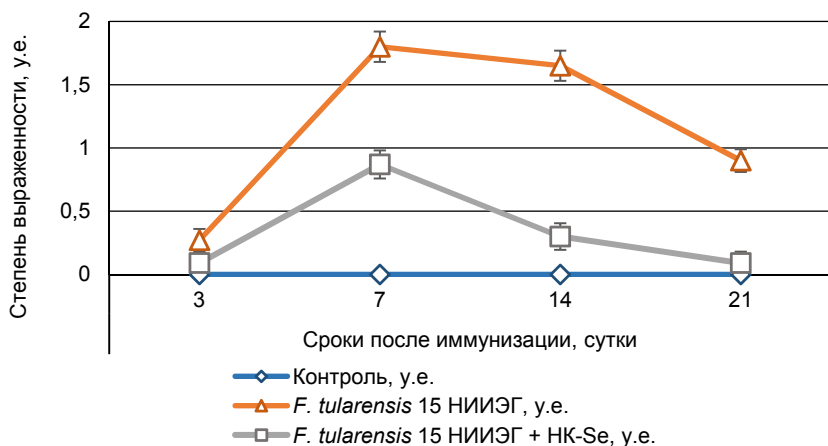


Рис. 14. Динамика морфологических изменений в органах белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ совместно с селенорганическим препаратом 974zh

Бруцеллезная вакцина *B. abortus* 19 ВА также вызывала морфологические изменения органов у мышей, но максимального уровня они достигали не к 7-м, а к 14-м суткам. Вероятно, это связано с более длительным инкубационным периодом для *B. abortus* 19 ВА (рис. 15). Кроме того, к концу эксперимента (21-е сутки) у животных, иммунизированных *B. abortus* 19 ВА, уровень морфологических изменений в органах и тканях белых мышей снижался и приближался к контрольному значению, в отличие от группы, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ (рис. 14), у которых степень морфологических изменений на 21-е сутки оставалась на высоком уровне. Исследуемый

препарат 974zh на порядок снижал реактогенность бруцеллезной вакцины (рис. 15).

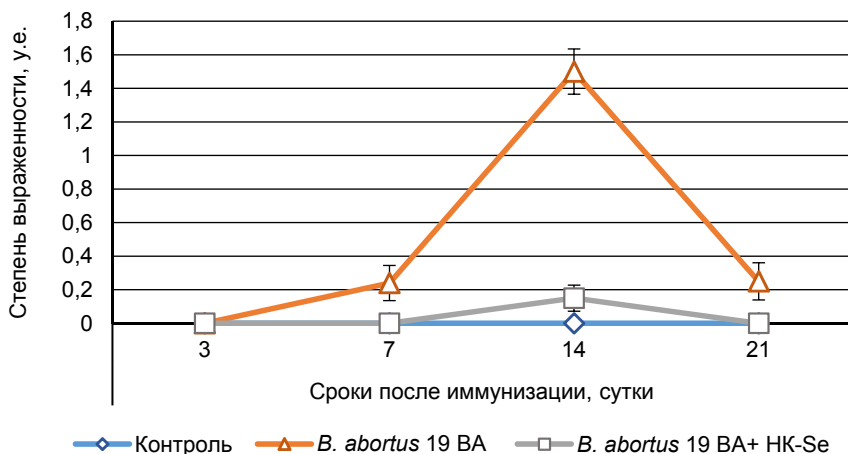


Рис. 15. Динамика морфологических изменений органов белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *B. abortus* 19 BA и термоэкстрактами совместно с селенорганическим препаратом 974zh

Как было сказано ранее, реактогенность живых вакцин опосредована активацией образования АФК. При низком антиоксидантном потенциале, накопление АФК может привести к супрессии иммунной системы. Исследуемый в настоящей работе синтетический препарат 974zh в значительной степени компенсировал реакцию опытных животных на введение живых туляремийной и бруцеллезной вакцин.

При изучении патоморфологии реактивных процессов, вызванных аттенуированными и авирулентными штаммами возбудителей, выявляется определенная аналогия с морфологическими изменениями при экспериментальном инфекционном процессе.

Таким образом, при изучении действия препарата 974zh на патологические изменения в органах экспериментальных животных, иммунизированных живой туляремийной и бруцеллезной вакцинами продемонстрировано его иммуномодулирующее действие (снижение реактогенности вакцин) на макроорганизм.

2.5. Особенности изменения в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных в динамике вакцинального процесса, вызванного *Bacillus anthracis* в сочетании с селеноорганическим соединением

При вскрытии у 50 % животных на ранних сроках исследования (3–7 сут) в месте введения *B. anthracis* Sterne 34F₂ имеет место гиперемия кожи, подкожной клетчатки и подлежащих мышц, небольшая инъеция сосудов, селезенка увеличена и полнокровна. У 17 % белых мышей в эти сроки отмечается небольшой воспалительный отек тканей, распространяющийся со стороны введения на область паха. Также на 3–7 сут у 30 % белых мышей регистрируется умеренное увеличение, уплотнение и полнокровия региональных лимфатических узлов, неравномерное полнокровие легких, печень полнокровна, слегка дрябловата, у некоторых животных с тусклой поверхностью разреза, почки обычного вида, но на разрезе слои не отчетливо различимы. Надпочечники слегка увеличены. Начиная с 14 сут все эти изменения нивелируются, и к 21 сут видимые изменения отсутствуют.

При совместном введении *B. anthracis* Sterne 34F₂ с селеноорганическим соединением 974zh все вышеперечисленные изменения менее выражены и регистрируются менее чем у 35 % животных. На 21 сут исследования эти изменения не регистрируются.

В селезенке белых мышей, привитых *B. anthracis* Sterne 34F₂ (рис. 16, 18) и *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с экспериментальным селеноорганическим соединением 974zh (рис. 17, 19), увеличение объема белой пульпы отмечается с 3 сут. Объем белой пульпы от исследуемого объема достигает максимального значения на 7 сутки и составляет у животных первой опытной группы $43,2 \pm 0,4$ % и $52,1 \pm 0,5$ % у белых мышей второй опытной группы, что выше показателя контрольной группы на 21,0 и 29,9 % ($p < 0,05$) соответственно. При этом у животных, иммунизированных *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с экспериментальным селеноорганическим соединением 974zh, данный показатель выше, чем у белых мышей, иммунизированных *B. anthracis* Sterne 34F₂ в 1,2 раза ($p < 0,05$). Начиная с 14-х по 21 сут объем белой пульпы у животных обеих опытных групп снижался. Достоверных различий между группами в эти сроки наблюдения не выявлено (табл. 3).

Таблица 3

Соотношение объемных долей красной и белой пульпы селезенки
экспериментальных животных ($M \pm m$, %)

Антиген	Структурные компоненты	Сроки исследования, сутки			
		3	7	14	21
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂	БП	34,7 ± 0,9	43,2 ± 0,4	43,1 ± 0,9	28,7 ± 1,9
	КП	65,3 ± 1,3	56,8 ± 1,8	47,9 ± 1,7	69,3 ± 3,7
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ + 974zh	БП	36,3 ± 1,5	52,1 ± 0,5*	43,59 ± 0,9	29,7 ± 1,2
	КП	63,7 ± 1,1	56,41 ± 0,8	47,92 ± 0,4	70,3 ± 1,3
Контроль	БП	22,2 ± 0,7			
	КП	77,5 ± 0,4			

Примечание. БП – белая пульпа; КП – красная пульпа; * – $p < 0,05$ (по сравнению с контролем)

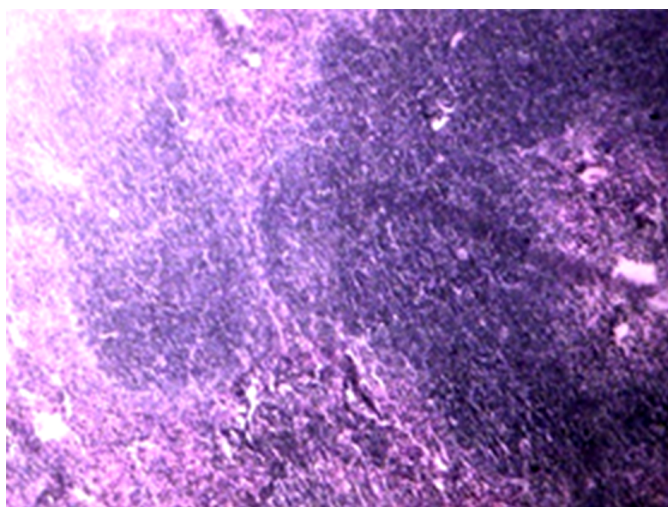


Рис. 16. Селезенка белой мыши, привитой *B. anthracis* Sterne 34F₂ + 974zh (7 сут). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10

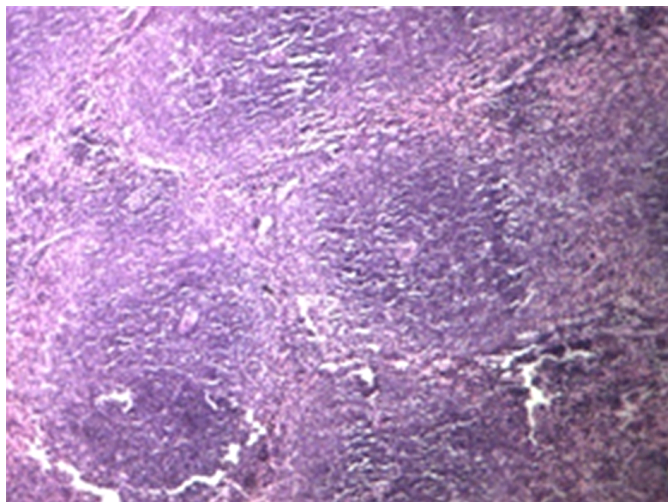


Рис. 17. Селезенка белой мыши, привитой *B. anthracis* Sterne 34F₂ (7 сут). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10

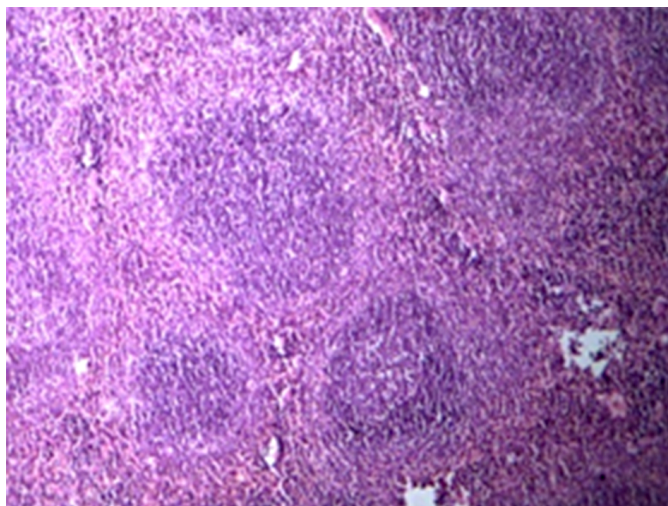


Рис. 18. Селезенка белой мыши, привитой *B. anthracis* Sterne 34F₂ + 974zh (14 сут). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10

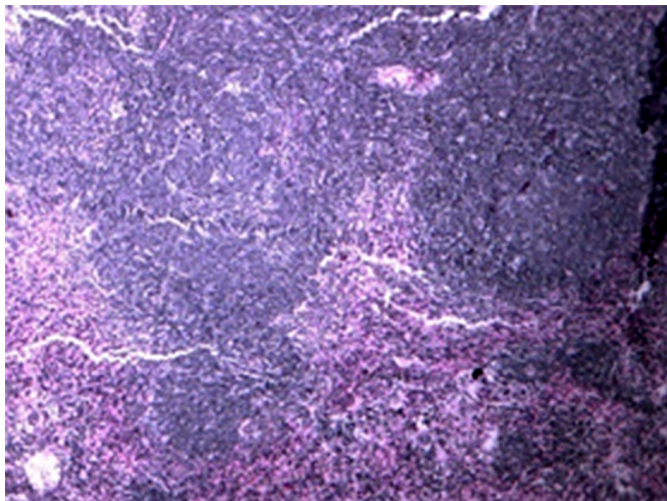


Рис. 19. Селезенка белой мыши, привитой *B. anthracis* Sterne 34F₂ (14 сут). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10

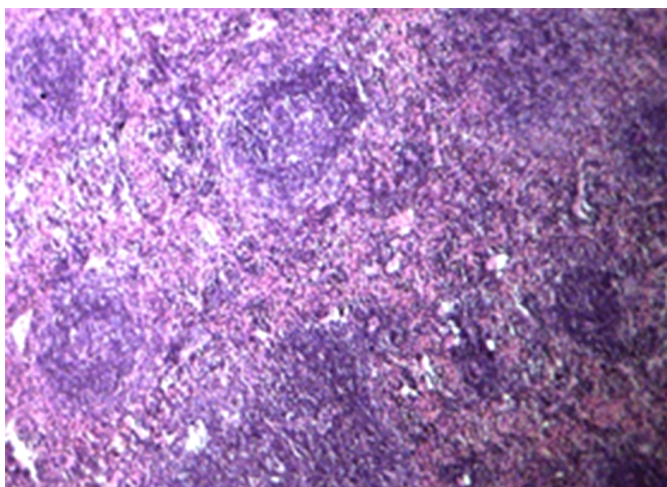


Рис. 20. Селезенка белой мыши (контроль). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10

При морфометрическом исследовании селезенки имеют место изменения в структурных компонентах белой пульпы (табл. 4). На 7 сутки отмечено достоверное увеличение периартериальной зоны

в фолликулах селезенки белых мышей в первой и во второй опытных группах по сравнению с контролем. Достоверных различий между опытными группами не установлено. На 3 сутки выявлено увеличение реактивного центра в 1,2 раза во второй группе по сравнению с первой опытной группой, за счет усиления процессов бласттрансформации, деления и дифференцировки клеток, появлению бластов. На 14–21 сутки данный показатель снижался, но к 21 суткам исследования был в 1,5 раза достоверно выше во второй группе по сравнению с первой.

ТАБЛИЦА 4

Соотношение объемных долей белой пульпы селезенки экспериментальных животных ($M \pm m$, %)

Антиген	Структурные компоненты	Сроки исследования, сутки			
		3	7	14	21
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂	ПЗ	4,2 ± 0,6	5,5 ± 0,5	4,1 ± 0,7	3,9 ± 0,8
	РЦ	5,3 ± 0,4	14,2 ± 0,8	12,7 ± 0,5	8,7 ± 0,7
	МЗ	29,8 ± 0,9	39,9 ± 0,1	38,7 ± 0,9	32,3 ± 0,4
	КЗ	30,2 ± 0,4	41,4 ± 0,4	39,4 ± 0,1	30,9 ± 0,9
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ + 974zh	ПЗ	4,9 ± 0,8	6,9 ± 1,1*	5,1 ± 0,6	4,8 ± 1,2
	РЦ	6,5 ± 0,9*	14,7 ± 0,8	13,1 ± 0,5	12,9 ± 0,4*
	МЗ	31,2 ± 1,1	40,0 ± 0,4	39,1 ± 0,9	37,4 ± 0,8*
	КЗ	35,1 ± 0,2*	43,8 ± 1,1	38,5 ± 0,4	38,0 ± 0,5*
Контроль	ПЗ	3,8 ± 0,2			
	РЦ	4,3 ± 0,1			
	МЗ	24,1 ± 0,9			
	КЗ	24,2 ± 0,5			

Примечание. ПЗ – периартериальная зона; РЦ – реактивный центр; МЗ – мантийная зона; КЗ – краевая зона; * – $p < 0,05$ (по сравнению с *B. anthracis* Sterne 34F₂).

Структурные компоненты лимфатических фолликулов селезенки белых мышей представлены на рисунках 21–25.

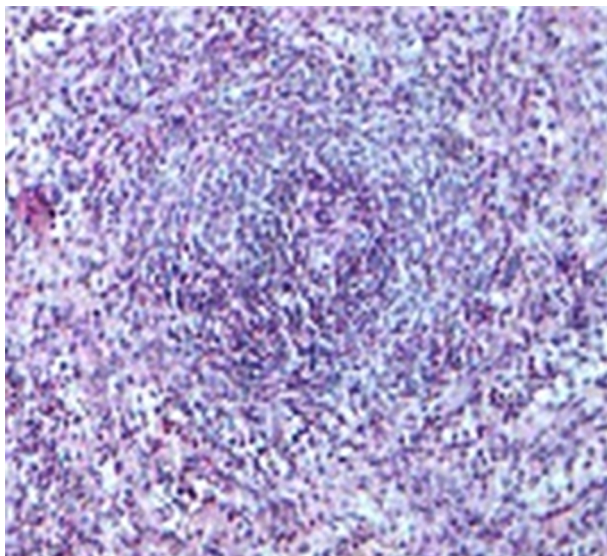


Рис. 21. Фолликул селезенки белой мыши (контроль). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20

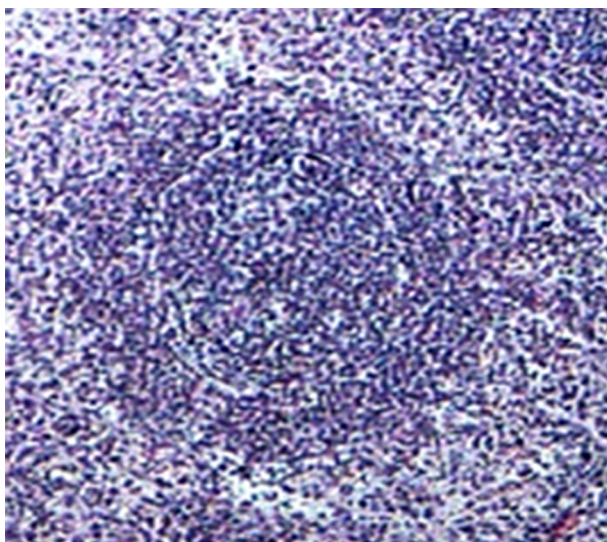


Рис. 22. Селезенка белой мыши, привитой *B. anthracis* Sterne 34F₂ (7 сут). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20

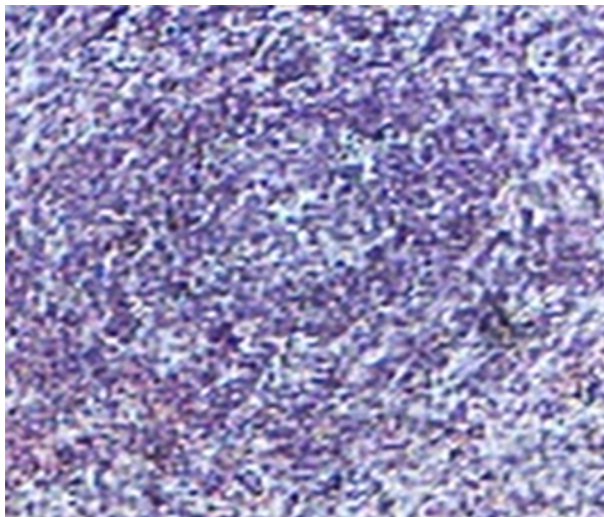


Рис. 23. Селезенка белой мыши, привитой *B. anthracis* Sterne 34F₂ (14 сут). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20

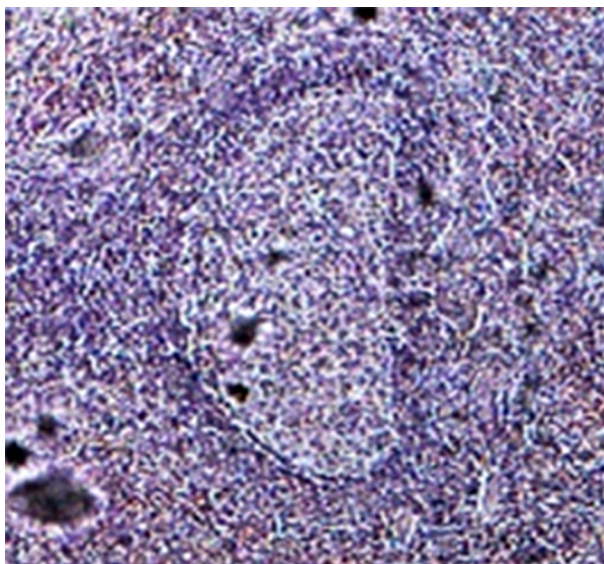


Рис. 24. Селезенка белой мыши, привитой *B. anthracis* Sterne 34F₂ + 974zh (7 сут). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20

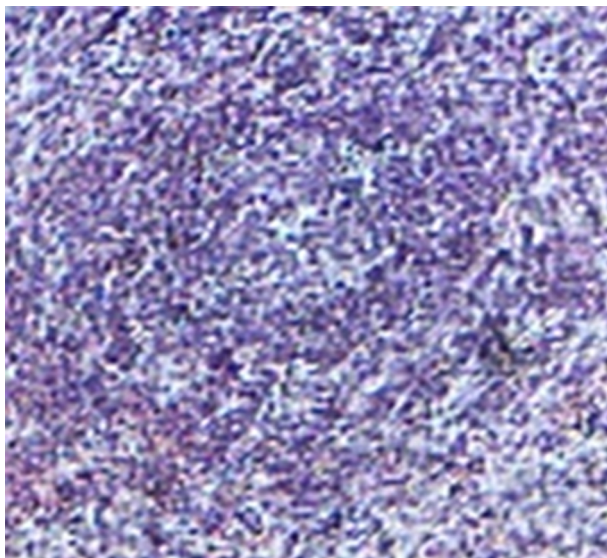


Рис. 25. Селезенка белой мыши, привитой *B. anthracis* Sterne 34F₂ + 974zh (14 сут). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20

Количественные показатели содержания плазмоцитов представлены на рисунке 26.

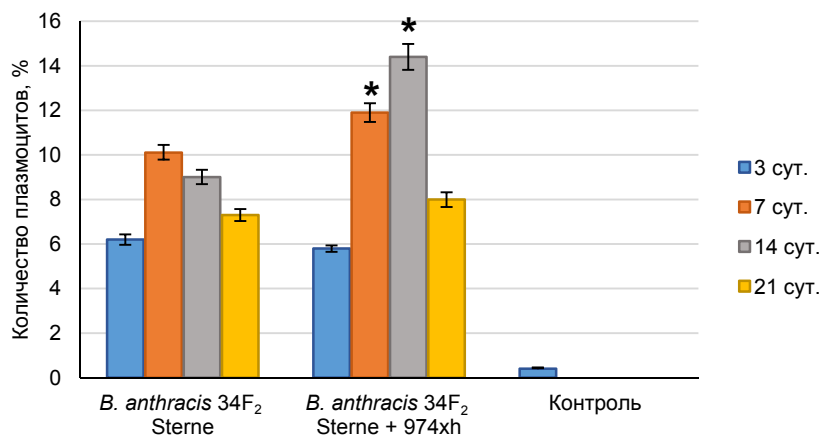


Рис. 26. Изменения показателей содержания плазмоцитов в динамике вакцинального процесса, вызванного вакцинным штаммом *B. anthracis* Sterne 34F₂ и на фоне иммуномодуляции. * $p < 0,05$ (по сравнению с *B. anthracis* Sterne 34F₂)

При исследовании гистологических срезов селезенки белых мышей, привитых *B. anthracis* Sterne 34F₂ и *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с экспериментальным селеноорганическим соединением 974zh, выявлено, что начиная с 7 сут исследования процентное соотношение плазматических клеток возрастает, превышая значения в первой группе 1,3 раза ($p < 0,05$) (рис. 26). К 14 сут этот показатель увеличивается и достигает максимального значения во второй группе, что в 1,5 раза выше ($p < 0,05$), чем в первой группе экспериментальных животных. На 21 сутки исследования, число плазматических клеток в селезенке снижается как в первой, так и во второй опытных группах, при этом статистически значимых различий выявлено не было.

В лимфатических узлах белых мышей, привитых *B. anthracis* Sterne 34F₂ и *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с препаратом 974zh, увеличение объема доли коркового вещества отмечается с 3 сут после иммунизации. Максимальное значение площади коркового вещества от исследуемой площади регистрируется у опытных животных на 7-е сутки (рис. 28, 29) и составляет $48,7 \pm 0,8 \%$ у белых мышей первой опытной группы и $57,4 \pm 0,4 \%$ второй группы. При этом следует заметить, что у животных, иммунизированных *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с препаратом 974zh, данный показатель выше, чем у белых мышей, иммунизированных *B. anthracis* Sterne 34F₂, в 1,2 раза ($p < 0,05$).

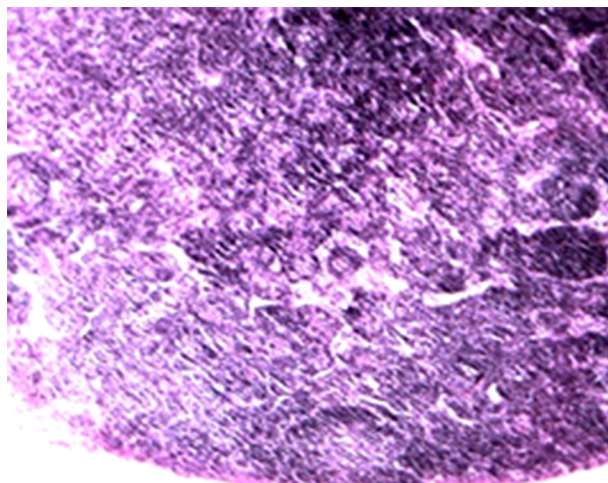


Рис. 27. Регионарный лимфатический узел интактной белой мыши. Окраска гематоксилин и эозин. Ок. 10, об. 10

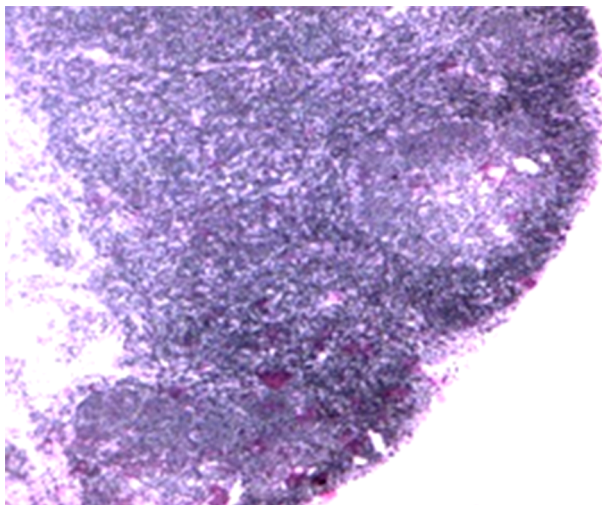


Рис. 28. Регионарный лимфатический узел белой мыши, иммунизированной *B. anthracis* Sterne 34F₂ (7-е сут). Окраска гематоксилин и эозин. Ок. 10, об. 10

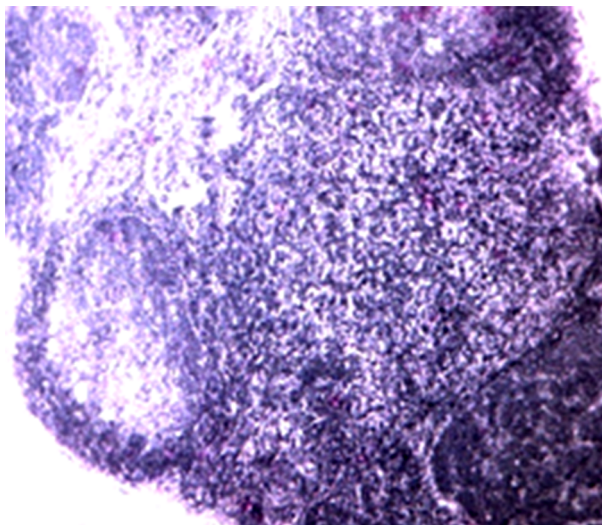


Рис. 29. Региональный лимфатический узел белой мыши иммунизированной *B. anthracis* Sterne 34F₂ с 974zh (7-е сут). Окраска гематоксилин и эозин. Ок. 10, об. 10

Начиная с 14-х сут объем доли коркового вещества у животных опытных групп снижается, оставаясь статистически достоверно в 1,2 раза выше во второй группе по сравнению с первой (табл. 5).

Таблица 5

Соотношение структурных компонентов лимфатических узлов
экспериментальных животных ($M \pm m$, %)

Антиген	Зоны	Сроки исследования, сутки			
		3	7	14	21
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂	КВ	35,9 ± 0,7	48,7 ± 0,8	43,7 ± 0,3	39,7 ± 0,5
	ПКЗ	10,9 ± 0,4	13,8 ± 0,4	12,2 ± 0,7	11,1 ± 0,3
	МВ	55,2 ± 0,9	37,5 ± 0,3	40,1 ± 0,6	49,2 ± 1,2
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ + 974zh	КВ	35,7 ± 0,9	57,4 ± 0,4*	52,2 ± 0,3*	40,2 ± 0,3
	ПКЗ	10,9 ± 0,5	13,9 ± 0,7	12,5 ± 0,3	10,9 ± 0,9
	МВ	53,4 ± 1,1	35,7 ± 0,8	39,3 ± 0,6	48,9 ± 0,5
Контроль	КВ	31,2 ± 0,7			
	ПКЗ	10,9 ± 0,9			
	МВ	57,7 ± 0,5			

Примечание. КВ – корковое вещество; ПКЗ – паракортикальная зона; МВ – мозговое вещество; * – $p < 0,05$ (по сравнению с *B. anthracis* Sterne 34F₂).

Увеличение объема доли коркового вещества происходит за счет возрастания числа фолликулов со светлыми центрами, так называемыми центрами размножения или реактивными центрами. Их увеличение сопровождается усилением в них процессов пролиферации и бласттрансформации лимфоцитов, что характеризует иммунологическую перестройку органа. При антигенной стимуляции происходят ключевые процессы в зонах лимфатического узла – в темной зоне реактивного центра происходит стимуляция антигеном В-клеток (при участии макрофагов, дендритных клеток и Т-хелперов) и мутагенез стимулированных В-клеток (центробластов). В светлой базальной зоне фолликула лимфатического узла (реактивный центр) происходит отбор среди продуктов мутагенеза (центроцитов) клеток с наибольшим сродством к антигену (такие клетки превращаются в В-иммунобласты – плазмобласты, происходит процесс бласттрансформации). В светлой апи-

кальной зоне реактивного центра происходит интенсивное деление В-иммунобластов. В короне лимфатического узла образовавшиеся клетки проходят дифференцировку и зрелые плазматические клетки постепенно мигрируют в мозговые тяжи. При бласттрансформации клеток часть из них превращаются В-клетки памяти.

Структурный и клеточный состав лимфатических узлов определяет оптимальный уровень активизации иммунного ответа, который сопровождается стимуляцией метаболической активности лимфоидных клеток и приводит к увеличению количества пиронинофильных клеток (антителообразующих или В-лимфоцитов). При просмотре гистологических срезов лимфатических узлов белых мышей, привитых *B. anthracis* Sterne 34F₂, и *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с экспериментальным соединением 974zh, установлено, что начиная с 3 сут исследования у животных процентное соотношение плазматических клеток по сравнению с контролем возрастает (таблица 6).

Таблица 6

Количество плазмоцитов в мозговых тяжах региональных лимфатических узлов экспериментальных животных ($M \pm m$, %)

Антиген	Сроки исследования, сутки			
	3	7	14	21
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂	12,21 ± 0,58	18,92 ± 0,64	10, 14 ± 0,38	6,23 ± 0,28
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ + 974zh	12,58 ± 0,92	20,37 ± 0,59	14,18 ± 0,78*	6,86 ± 0,45
Контроль	0,35 ± 0,01			

На 3 сут количество антителообразующих клеток у иммунизированных животных обеих опытных групп статистически не отличаются между собой. Максимальное количество плазматических клеток регистрируется на 7 сут (рис. 30, 31), у животных, иммунизированных *B. anthracis* Sterne 34F₂, достигают 18,92 ± 0,64 %, во второй опытной группе – 20,37 ± 0,59 %, тем не менее, достоверных различий между группами не выявлено. На 14 сутки исследования число плазматических клеток в лимфатических узлах снижается, при этом оставаясь статистически выше во второй группе по сравнению с первой группой животных в 1,5 раза ($p < 0,05$).

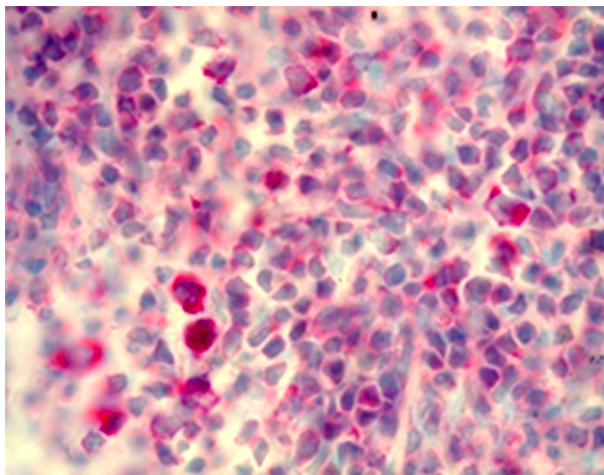


Рис. 30. Регионарный лимфатический узел белой мыши, иммунизированной *B. anthracis* Sterne 34F₂ (7-е сут.). Проплиферация плазматических клеток. Окраска по Браше. Ок. 10, об. 10

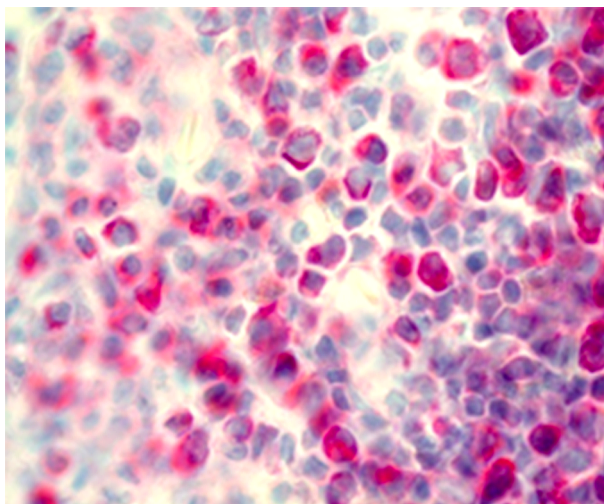


Рис. 31. Регионарный лимфатический узел белой мыши, иммунизированной *B. anthracis* Sterne 34F₂ с 974zh (7-е сут.). Проплиферация плазматических клеток. Окраска по Браше. Ок. 10, об. 10

Можно предположить, что селеноорганическое соединение 974zh обладает не только антиоксидантными свойствами, но и им-

муномодулирующим действием на клеточный и гуморальный иммунитет, на что указывает увеличение числа антителообразующих клеток.

При изучении изменения клеточного состава в лимфатических узлах вакцинированных животных установлено, что в реактивных центрах, начиная с 3 сут отмечается увеличение бластных клеток, их максимальное число приходится на 7 сут исследования и составляет $16,9 \pm 0,6$ и $17,8 \pm 0,9$ % соответственно в первой и второй опытных группах, что выше значений в контрольной группе в 3,7 и 3,9 раза ($p < 0,05$) соответственно. К 21 сут показатели снижаются, но остаются несколько выше контрольных значений. Отмечается на 7–14 сут незначительное снижение абсолютного числа малых и средних лимфоцитов. Содержание макрофагов в фолликулах увеличивается с 3 сут и максимального значения достигает к 7–14 сут, превосходя значения в контроле у животных, иммунизированных *B. anthracis* Sterne 34F₂, в 2,7 раза ($p < 0,05$) и у белых мышей, привитых *B. anthracis* Sterne 34F₂ с 974zh, в 3,1 раза ($p < 0,05$). Содержание малых лимфоцитов и ретикулярных клеток оставались в пределах контрольных значений.

Однако, количество малых лимфоцитов в короне лимфатического узла у иммунизированных животных статистически выше на 14–21 сут, чем в контрольной группе животных. Максимальное число малых лимфоцитов отмечается у белых мышей, привитых *B. anthracis* Sterne 34F₂ с 974zh, на 7 сут исследования и превышает значение в контроле. Таким образом, можно предположить, что повышение числа бластных форм клеток в реактивном центре лимфатического фолликула опытных животных приводит к увеличению числа малых лимфоцитов и плазматических клеток в короне узла.

Следует заметить, что клеточная пролиферация (общее число клеток) наиболее выражена на 7 сут исследования у животных второй опытной группы и составляет $194,8 \pm 5,8$, у белых мышей первой группы этот показатель ниже – $176,8 \pm 4,7$, против контрольных значений – $156,05 \pm 3,9$. Это можно связать за счет усиленного притока клеток из тимуса и костного мозга под действием стимуляции антигена (табл. 7).

Таблица 7

Клеточный состав лимфатических узлов экспериментальных животных

Антиген	Зоны	Структурные компоненты	Сроки исследования, сутки			
			3	7	14	21
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂	РЦ	БК	16,5 ± 0,9*	16,9 ± 0,6*	10,2 ± 0,4*	6,1 ± 0,3
		СЛ	41,9 ± 1,5	40,8 ± 1,3	44,2 ± 1,1	44,8 ± 1,2
		МЛ	12,8 ± 0,8	11,5 ± 0,6	11,8 ± 0,7	12,6 ± 0,5
		РК	3,4 ± 0,2	3,6 ± 0,5	3,7 ± 0,5	3,5 ± 0,2
		МФ	2,1 ± 0,1*	3,3 ± 0,2*	3,1 ± 0,3*	3,0 ± 0,2*
	КУ	МЛ	80,4 ± 1,9	84,8 ± 2,1	92,4 ± 1,8*	89,8 ± 1,9
		РК	3,3 ± 0,3	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,4	3,3 ± 0,3
		ПК	2,8 ± 0,1*	8,4 ± 0,3**	6,8 ± 0,7**	6,1 ± 0,5*
	Общее число клеток		165,2 ± 6,2	170,8 ± 4,7	185,7 ± 2,9	171,2 ± 3,7
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ + 974 zh	РЦ	БК	15,6 ± 0,7*	17,8 ± 0,9*	12,5 ± 0,7*	7,5 ± 0,3*
		СЛ	39,9 ± 0,9	39,0 ± 1,1	42,1 ± 0,4	43,5 ± 1,1
		МЛ	12,6 ± 0,6	11,7 ± 0,5	11,6 ± 0,7	12,2 ± 0,5
		РК	3,0 ± 0,4	3,3 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,2
		МФ	2,5 ± 0,1*	3,8 ± 0,1*	2,6 ± 0,1*	2,1 ± 0,1*
	КУ	МЛ	80,4 ± 1,7	86,2 ± 2,1	100,7 ± 1,9*	99,8 ± 2,5*
		РК	3,2 ± 0,2	3,4 ± 0,1	3,6 ± 0,2	3,1 ± 0,2
		ПК	3,1 ± 0,4*	9,6 ± 0,4**	8,1 ± 0,4**	6,9 ± 0,4*
	Общие число клеток		160,3 ± 4,9	174,8 ± 5,8	185,4 ± 6,1	180,2 ± 7,2
Контроль	РЦ	БК	4,6 ± 0,80			
		СЛ	46,9 ± 1,20			
		МЛ	12,6 ± 0,70			
		РК	3,5 ± 0,90			
		МФ	1,2 ± 0,20			
	КУ	МЛ	79,4 ± 1,70			
		РК	3,5 ± 0,50			
		ПК	0,35 ± 0,01			
	Общие число клеток		156,05 ± 3,9			

Примечание. РЦ – реактивный центр; КУ – корона узла; БК – бластные формы клеток; СЛ – средние лимфоциты; МФ – макрофаги; МЛ – малые лимфоциты; РК – ретикулярные клетки; ПК – плазматические клетки; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (по сравнению с контролем).

В лимфатических узлах также отмечается на 7–14 сут увеличение доли паракортикальной зоны. Паракортикальная зона – диффузная, может образовывать сплошной слой между фолликулами и мозговыми тяжами, которая является Т-зависимой, где происходит антиген-зависимая пролиферация и дифференцировка Т-лимфоцитов. У белых мышей, привитых *B. anthracis* Sterne 34F₂, она составляет $13,8 \pm 0,4 \%$ и $12,2 \pm 0,7 \%$, что на $2,9 \%$ и $1,3 \%$ ($p < 0,05$) больше контрольных значений соответственно. У животных, привитых *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с экспериментальным соединением 974zh, показатели незначительно больше, чем в первой группе: $13,9 \pm 0,7$ и $12,5 \pm 0,3$, превосходя контрольные значения на $3,0$ и $1,6 \%$ ($p < 0,05$), что свидетельствует о усилении антиген-зависимой пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов.

Таким образом, показано, что при иммунизации белых мышей *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с экспериментальным селеноорганическим соединением 974zh морфологические изменения как в тимусзависимых, так и тимуснезависимых зонах лимфатических узлов, клеточная пролиферация и продуцирование антителообразующих клеток более выражено, чем у животных привитых, *B. anthracis* Sterne 34F₂. Следовательно, стимуляция иммунных реакций во второй группе животных более выражена, что способствует эффективной иммунной перестройке защитной системы организма и усилению иммунного ответа.

2.6. Морфологические и функциональные изменения в тимусе и надпочечниках экспериментальных животных в динамике вакцинального процесса, вызванного *F. tularensis* 15 НИИЭГ в сочетании с селеноорганическим соединением

В качестве экспериментальной модели в опыте использовали 100 сертифицированных беспородных белых мышей (НПО «Вектор») обоих полов массой 20 ± 2 г, находящихся в стандартных условиях содержания.

Животных иммунизировали *F. tularensis* 15 НИИЭГ подкожно во внутреннюю поверхность правого бедра в объеме $0,5$ мл, первой и второй группе в дозе 100 КОЕ, третьей и четвертой – 1000 КОЕ. Одновременно, белым мышам второй и четвертой группы вводили во внутреннюю поверхность левого бедра селеноорганическое соединение 974zh в объеме $0,5$ мл, в дозе $2,5$ мг/кг веса. Животных кон-

трольной группы инокулировали в том же объеме и тем же способом физиологическим раствором рН $-7,2 \pm 1$.

Белых мышей выводили из эксперимента гуманным способом, через 3-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки с начала эксперимента. Надпочечники и тимус извлекали и взвешивали на лабораторных электронных весах (CAUW 220) с погрешностью 0,1 мг. Анатомический материал для гистологического исследования (тимус и надпочечники) фиксировали в 10% водном растворе формалина рН 7,0–7,2. Обработку взятого на исследование материала проводили по общепринятой схеме [73]. Полутонкие парафиновые срезы окрашивали раствором гематоксилина и эозина. Для выявления ацидофильных и базофильных гранул в клетках надпочечников применяли окраску по Массону с анилиновым синим [74]. Автоматический анализ изображения производили с помощью светового микроскопа «Zeiss» (Германия) с видеокамерой «Ахиосам Icc3» разрешение $2080 \times 1540 = 3,3$ Мпикс и компьютерной программы «Motic Images Plus» (версия 2). Морфологическую характеристику оценки объемных долей коркового и мозгового вещества тимуса и структурных зон надпочечников проводили с использованием программы компьютерных программ «Motic Images Plus» (версия 2) и «Axio Vision Rel 4,8». Для оценки состояния внутренних органов использовали интегральный показатель – процентное отношение массы органа к массе тела – массовый коэффициент. Общую площадь надпочечников, коркового и мозгового вещества определяли в мм² при увеличении в 10×10 раз, по формуле:

$$S = \pi/4 \times D \times d,$$

где: $S_{\text{надп.}}$ – площадь надпочечника; D и d – два перпендикулярных измерения.

Достоверность результатов исследования получали математическими методами статистической обработки с применением сравнительного анализа по t-критерию Стьюдента и с применением компьютерной программы «Statistica», версия 6 (Copyright©Stat Soft Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897) и пакета программ Microsoft Office Excel (2003). Результаты считали достоверными, при $p < 0,05$ по отношению к контролю.

При иммунизации белых мышей разными дозами вакцинного штамма туляремиального микроба отмечается характерная, но умеренно выраженная патоморфологическая картина для данной инфекции.

Следует заметить, что при введении *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ в дозе 1000 КОЕ, изменения более значительные, чем при дозе на порядок ниже, что подтверждает имеющиеся сведения о роли гематогенной диссеминации возбудителя в поражении органов и аллергизации организма [75]. Наиболее выраженным патологоанатомическим проявлением являются формирование на месте введения культуры (7-е сут) гнойного разлитого воспаления клетчатки (флегмоны) с отсутствием четких ее границ, инъекция сосудов и отек подкожной ткани. В региональных лимфатических узлах на 7-е сут после введения большой дозы вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ возникают экссудативные воспалительные процессы с последующей гиперплазией узла к 14-м сут, паховый узел также заметно увеличен, плотный. Селезенка, преимущественно, бледная или бледно-серая – обескровленная, дряблая, визуально увеличена почти вдвое по сравнению с селезенкой контрольных мышей, края неровные, тонкие. В легких, начиная с 7-х сут, обнаруживают, преимущественно в верхушке верхней доли правого легкого, точечные геморрагические очажки. У 60 % животных печень уплотнена, полнокровна или глинистого цвета с тонкими краями, что указывает на дистрофические изменения. Надпочечники у большинства мышей увеличены в 1,2–2,0 раза. Начиная с 3 сут отмечается заметная редукция тимуса.

У белых мышей, привитых *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 100 КОЕ, наблюдалась спленомегалия с 7-х по 14-е сут исследования, при этом цвет и консистенция органа не отличались от таковых у контрольных животных. В других органах видимые патоморфологические изменения отсутствовали.

У животных, которым вводили вместе с вакциной селеноорганическое соединение 974zh, при вскрытии отмечались те же изменения, что и у белых мышей, привитых только вакциной в соответствующей дозе.

При интоксикациях, стрессах, инфекционных процессах и других неблагоприятных воздействиях на организм тимус заметно уменьшается в размере. Так, если в контрольной группе при средней массе животного $26,5 \pm 1,43$ г масса тимуса равнялась $0,076 \pm 0,013$ г, массовый коэффициент составил $0,286 \pm 0,018$ %, то у животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 1000 КОЕ, отмечается

резкая инволюция тимуса на всех сроках наблюдения. Минимальное значение массы тимуса (масса животного $21,8 \pm 2,87$ г) приходится на 14-е сут и составляет $0,019 \pm 0,001$ г, что в 4,0 ($p < 0,05$) раза меньше по сравнению с показателями в контрольной группе животных, массовый коэффициент ниже по сравнению с контролем в 15,1 ($p < 0,05$) и составляет $0,087 \pm 0,012$ %. Следует отметить, что при совместном введении вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 1000 КОЕ с селеноорганическим соединением массовый коэффициент был таким же – $0,088 \pm 0,014$ %, что указывает на отсутствие влияния вводимого препарата. Данные показатели сохранялись и на 21 сут исследования.

У животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 100 КОЕ, масса тимуса и массовый коэффициент снижались только на ранних сроках исследования, так на 3-е сут исследования при массе животного $25,6 \pm 1,98$ г масса тимуса составила $0,058 \pm 0,012$ г, на 7-е сут – $0,059 \pm 0,011$ г (масса животного в среднем составила $26,0 \pm 1,03$ г), массовый коэффициент составлял $0,227 \pm 0,011$ % и $0,226 \pm 0,026$ % соответственно, что ниже значения в контрольной группе, но в 2,8 ($p < 0,05$) раза выше, чем у животных привитых 1000 КОЕ *F. tularensis* 15. При совместном введении селеноорганического соединения и *F. tularensis* 15 массовый коэффициент на 3–7-е сут исследования также был ниже, чем у животных контрольной группы, но выше показателей у белых мышей, иммунизированных только вакцинным штаммом туляремийного микроба – $0,256 \pm 0,015$ г и $0,248 \pm 0,011$ г соответственно. С 14-х сут масса тимуса у животных обеих групп заметно увеличилась и к 21 сут соответствовала значению показателей контрольной группы (рис. 32).

При проведении морфометрических исследований установлено, что у животных, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 1000 КОЕ, а также при совместном введении с селеноорганическим соединением, имеет место изменения в структурных компонентах тимуса. Прежде всего следует отметить, что в результате цитолиза лимфоцитов в корковом веществе долек тимуса, происходит исчезновение четкой границы между корковым и мозговым веществом (рис. 33).

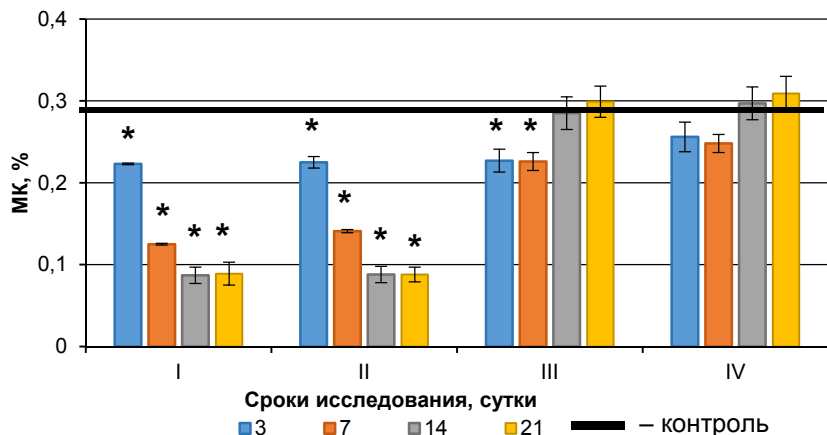


Рис. 32. Массовый коэффициент тимуса. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю. I – *F. tularensis* 15 НИИЭ 1000 КОЕ, II – *F. tularensis* 15 НИИЭ 1000 КОЕ + 974zh, III – *F. tularensis* 15 НИИЭ 100 КОЕ, IV – *F. tularensis* 15 НИИЭ 100 КОЕ + 974zh. МК – массовый коэффициент

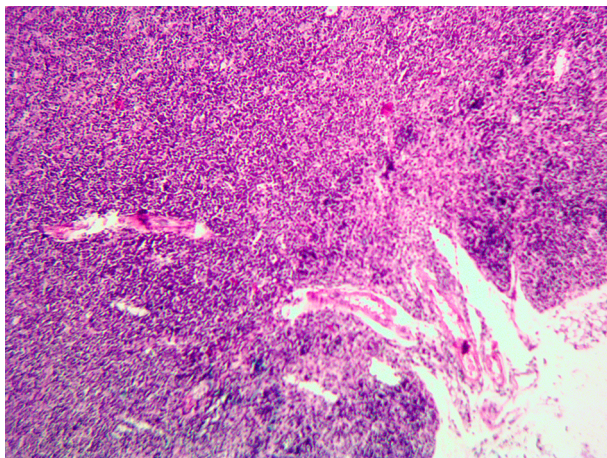


Рис. 33. Тимус белой мыши, иммунизированной *F. tularensis* 15 НИИЭ 1000 КОЕ. 7 сут. Четкая граница между корковым и мозговым веществом отсутствует. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10

Начиная с 3-х по 21-е сут исследования у мышей этих групп, по сравнению с контролем ($51,2 \pm 1,7\%$) наблюдалось достоверное снижение объема коркового вещества (от $35,9 \pm 1,5\%$ до $12,3 \pm 1,3\%$)

и $36,4 \pm 2,9 \%$ до $13,1 \pm 1,8 \%$), что объясняется развитием акцидентальной инволюции тимуса и стресс-реакцией (рис. 34, 35).

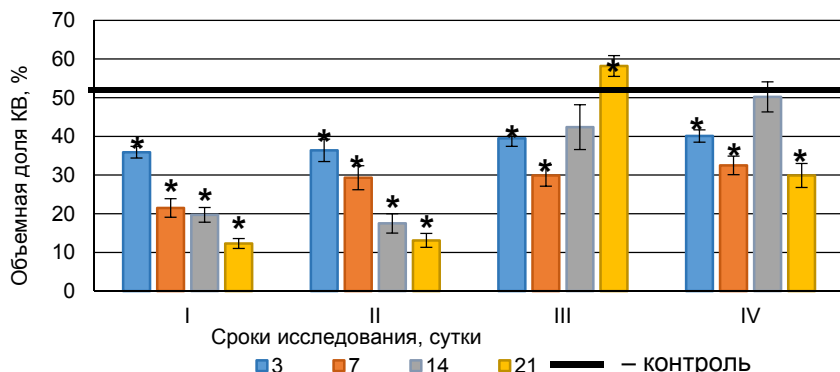


Рис. 34. Объемная доля коркового вещества тимуса белых мышей. KV – корковое вещество; * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; I – *F. tularensis* 15 НИИЭ 1000 КОЕ; II – *F. tularensis* 15 НИИЭ 1000 КОЕ + 974zh; III – *F. tularensis* 15 НИИЭ 100 КОЕ; IV – *F. tularensis* 15 НИИЭ 100 КОЕ + 974zh.

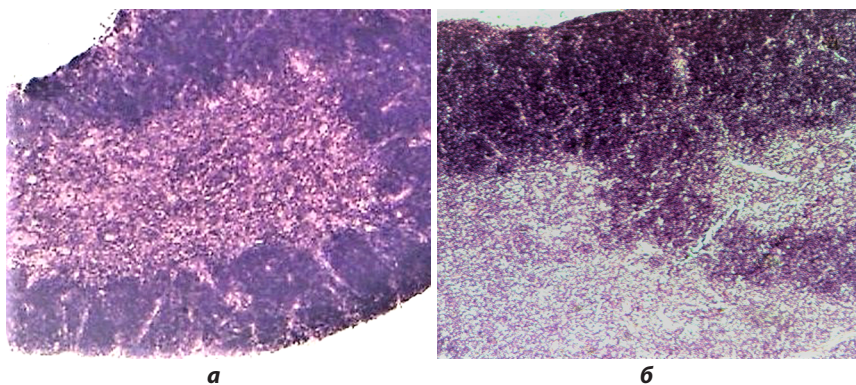


Рис. 35. Тимус белой мыши (21 сут): **а** – иммунизированная *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1000 КОЕ; **б** – *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1000 КОЕ с 974zh. Изменения соотношения объема коркового и мозгового вещества тимуса. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 0

У животных двух других групп (иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 100 КОЕ и в сочетании с селеноорганическим соединением), уменьшение объема коркового вещества наблюдается только на 3-е и 7-е сутки исследования (от $39,5 \pm 2,1 \%$ до $29,9 \pm 2,8 \%$

– у животных иммунизированных только вакцинным штаммом и от $40,1 \pm 1,6 \%$ до $32,5 \pm 2,4 \%$ при совместном введении с селеноорганическим соединением), с 14 сут отмечается достоверное увеличение объема коркового вещества по сравнению с контролем и составляет на 21 сут у животных первой группы $58,2 \pm 2,7 \%$ и второй – $59,9 \pm 3,1 \%$ (рис. 35), что превышает контрольные значения за счет увеличения лимфоидных клеток в корковом веществе тимуса (рис. 36).

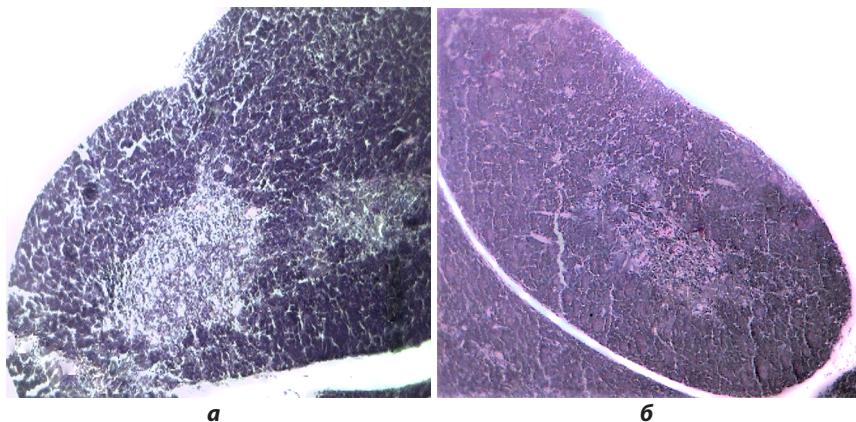


Рис. 36. Тимус белой мыши (21 сут): **а** – иммунизированная *F. tularensis* 15 НИИЭГ 100 КОЕ; **б** – иммунизированная *F. tularensis* 15 НИИЭГ 100 КОЕ с 974 zh. Изменения соотношения объема коркового и мозгового вещества тимуса. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

Таким образом, при иммунизации белых мышей вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (100 КОЕ) отмечается временная инволюция тимуса на 3-7-е сут, затем состояние органа возвращалось к норме и на более поздние сроки соотношение объема коркового и мозгового вещества у опытных животных превышает контрольные значения.

В мозговом веществе тимуса животных (рециркулирующий пул лимфоцитов), иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1000 КОЕ и с добавлением селеноорганического соединения, отмечается увеличение (3–14 сут) телец Гассала (тимических телец) с некротическими изменениями (рис. 37).

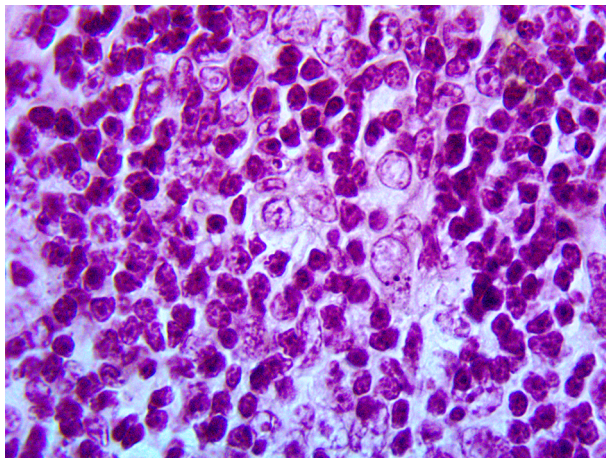


Рис. 37. Тимус белой мыши (14 сут), иммунизированной *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1000 КОЕ с 974zh. Тельца Гассалья с некротическими изменениями. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 100

Функция тимических телец до настоящего времени остается недостаточно изучена, но есть предположение, что они имеют фагоцитарную активность и участвуют в сложных иммунологических реакциях, а также способствуют созреванию тимоцитов [76, 77]. В случаях воздействия неблагоприятных факторов, в том числе и интоксикации, наблюдается выраженные изменения гистоархитектоники тимуса, уменьшение массы органа, гибель лимфоцитов, разрастание тимических телец [78].

У животных двух других групп количество тимических телец и их морфологическое состояние не изменялось на протяжении всего эксперимента, что также может служить показателем функциональной активности тимуса.

В корковом веществе надпочечников, преимущественно в пучковой зоне, образуются глюкокортикоиды – гормоны, которые влияют на углеводный и белковый обмен, а также повышают резистентность организма к стрессовой ситуации, снижают воспалительные и аллергические процессы и оказывают влияние на иммунную систему. При этом, следует отметить, что при высокой выработке гормона происходит подавление иммунной системы [79].

В мозговом веществе надпочечников нейроэндокринными клетками (хромаффиноцитами) вырабатывается адреналин, который оказывает противовоспалительное и противоаллергическое действие. Светлые клетки секретируют эпинефрин, а темные – норэпинефрин.

В ходе исследования установлено, что во все сроки у белых мышей контрольной группы масса двух надпочечников в среднем составляла $6,5 \pm 0,4$ мг, что соответствовала $0,0245$ % относительно массы животного. При морфометрическом исследовании площадь органа ($S_{\text{надп.}}$) составила $1,23 \pm 0,15$ мм², площадь мозгового вещества ($S_{\text{мозг.}}$) – $0,35 \pm 0,07$ мм², соответственно площадь коркового вещества ($S_{\text{корк.}}$) равнялось $0,88 \pm 0,09$ мм² (рис. 38). Установлено, что на долю коркового вещества приходится $71,6 \pm 1,75$ %, доля мозгового вещества составляет $28,4 \pm 1,89$ %. От общего объема коркового вещества клубочковая зона составила $15,1 \pm 1,04$ %, пучковая зона – $77,8 \pm 2,15$ % и сетчатая зона – $7,1 \pm 0,42$ %.

У животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ 100 КОЕ, масса надпочечников только на 3–7 сут исследования была незначительно выше контрольных значений – $7,4 \pm 0,5$ и $7,1 \pm 0,8$ мг соответственно, что составило $0,0295$ % и $0,0274$ % относительно массы животного (средняя масса животных составила $25,1 \pm 0,9$ и $25,9 \pm 1,1$). Общая площадь надпочечника на 3 сут составила $1,97 \pm 0,17$ мм², $S_{\text{мозг.}}$ – $0,55 \pm 0,05$ мм², $S_{\text{корк.}}$ – $1,42 \pm 0,11$ мм², на 7 сут – $1,92 \pm 0,21$ мм², $S_{\text{мозг.}}$ – $0,41 \pm 0,04$ мм², $S_{\text{корк.}}$ – $1,51 \pm 0,09$ мм² (рис. 38).

Следует отметить, что в мозговом веществе количество хромаффиноцитов, как темных, так и светлых, значительно увеличилось, что можно расценить как ответную реакцию на введения вакцины. При изучении структурно-функциональных зон коркового вещества установлено, что на ранних сроках исследования (3 сут) имело место снижение доли клубочковой зоны по сравнению с контролем в $1,6$ ($p < 0,05$) раза и составила $9,4 \pm 0,2$ %. На 7 сут $8,2 \pm 0,9$ %, что в $1,8$ ($p < 0,05$) раза меньше чем в контроле, при этом пучковая зона увеличилась – $83,2 \pm 2,5$ % и $85,1 \pm 2,7$ % от общего объема коркового вещества надпочечника, процентное соотношение сетчатой зоны на 3 сут соответствовало контрольным значениям – $7,4 \pm 0,62$ %, на 7 сут отмечалось небольшое снижение – $6,7 \pm 0,38$ %. Капсула

и сосудистая система надпочечников были без изменений, архитектура органа соответствует контролю. На более поздних сроках исследования (14–21 сут) все показатели соответствуют значениям контроля.

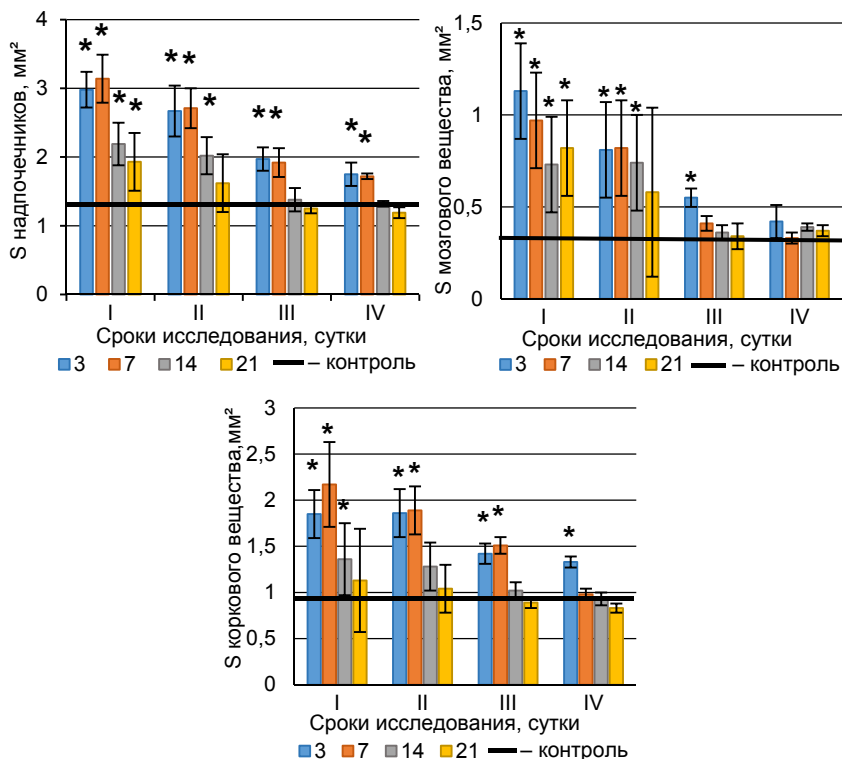


Рис. 38. Площади надпочечников, мозгового и коркового веществ. I – *F. tularensis* 15 НИИЭ 1000 КОЕ, II – *F. tularensis* 15 НИИЭ 1000 КОЕ + 974zh, III – *F. tularensis* 15 НИИЭ 100 КОЕ, IV – *F. tularensis* 15 НИИЭ 100 КОЕ + 974zh. S – площадь; * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Оценивая изменения в надпочечниках белых мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ 100 КОЕ совместно с селеноорганическим соединением 974zh, установлено, что во все сроки исследования масса надпочечников животных опытной группы статистически достоверных отклонений от контрольных значений

не имела. При гистологическом исследовании структурных изменений в клеточной архитектуре зон надпочечников не выявлено. Площадь мозгового вещества во все сроки наблюдения соответствовала контрольным значениям, что дает основание предположить об антиоксидантном действии вводимого соединения. На ранних сроках исследования отмечается небольшое снижение процентного соотношения сетчатой зоны 5,2 %, за счет увеличения клубочковой 12,8 % и пучковой зоны – 81,7 %. Участие надпочечников в системе стрессовых механизмов связано с пучковой зоной надпочечников, где происходит выработка спонгиоцитами глюкокортикоидов, которые оказывают выраженное действие на иммунную систему. Увеличение процентного соотношения клубочковой зоны можно расценивать как адаптивную перестройку организма. У животных, иммунизированных взвесью двухсуточной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 1000 КОЕ, а также при совместном введении с экспериментальным препаратом, гиперплазия надпочечников отмечалась во все сроки исследования. Максимальное значение массы надпочечников в обеих группах отмечалось на 14 сут у белых мышей, иммунизированных только вакциной, при массе животного $24,2 \pm 0,3$ г масса надпочечников была $8,3 \pm 0,4$ мг, массовый коэффициент составил 0,0343 %. Немного ниже показатели у белых мышей, привитых культурой *F. tularensis* 15 НИИЭГ совместно с экспериментальным препаратом: при массе животного $24,9 \pm 0,6$ г и массе надпочечников $7,7 \pm 0,2$ мг, массовый коэффициент составил 0,0312 %, что ниже, чем у животных предыдущей группы, но значительно выше значений в контрольной группе.

Микроскопически, начиная с 3 сут исследования у животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1000 КОЕ, общая площадь надпочечников увеличивается и максимальное значение приходится на 7 сут – $3,14 \pm 0,31$ мм², превосходя контрольные значения в 2,5 ($p < 0,05$) раза, с последующим снижением к 21 сут, оставаясь выше контрольных показателей в 1,57 ($p < 0,05$). При морфометрии надпочечников отмечено увеличение во все сроки исследования объема мозгового вещества, что указывает на стрессовую ситуацию. Также в мозговом веществе отмечается (3–7 сут) инъекция и кровоизлияния (рис. 39).

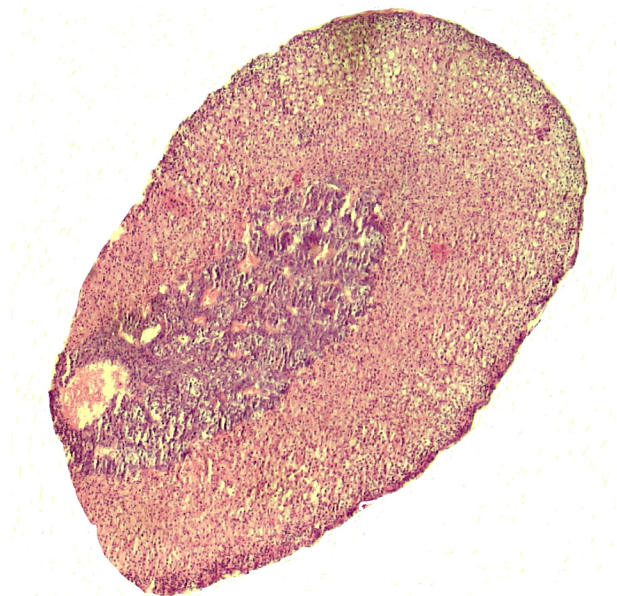


Рис. 39. Надпочечник белой мыши (7 сут), иммунизированной *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1000 КОЕ. Полнокровие сосудов, кровоизлияние. Ок. 10, об. 100

В сетчатой зоне коркового вещества наблюдается диффузная инфильтрация лимфоцитами, а на границе коркового и мозгового регистрируется повышенное содержание макрофагов. В клубочковой и пучковой зонах встречаются эндокриноциты с пиктоничными ядрами, количество которых увеличивается и достигает максимального значения к 14 сут исследования, с последующим снижением на 21 сут. У животных при совместном введении вакцинного штамма в дозе 1000 КОЕ с экспериментальным препаратом, все выше перечисленные изменения, также регистрировались, но носили менее выраженный характер.

При иммунизации *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 1000 КОЕ, а также с добавлением селеноорганического соединения анатомические, гистологические и морфофункциональные изменения однотипны, которые указывают на развитие иммунодефицитного состояния и аллергизацию животных.

Таким образом, по результатам исследования можно предположить об эффективности экспериментального селеноорганического

соединения 974zh при совместном введении *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 100 КОЕ. Выявленные изменения в тимусе указывают на стимуляцию иммунной перестройки организма (пролиферация лимфоидных клеток, увеличением объемной доли коркового вещества), а отсутствие изменений в структурных компонентах надпочечников (мозгового вещества) и в клеточной архитектуре зон указывает на нивелирование стрессовой ситуации, вызываемой введением вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 100 КОЕ.

2.7. Влияние селенорганического соединения 974zh на экспрессию генов *TLR2* и *TLR4* в клетках крови и селезенки экспериментальных животных при совместном введении с *Y. pestis* EV и *F. tularensis* 15

Изучение действия селенорганического соединения 974zh на экспрессию генов *TLR2* и *TLR4* в клетках периферической крови и селезенки экспериментальных животных при введении вакцинных штаммов проводили на сертифицированных беспородных белых мышах (250 шт.) обоих полов, стандартных по весу (18–20 г) и условиям содержания. Животных разделили по 125 особей для работы с каждым вакцинным штаммом (*Y. pestis* EV НИИЭГ и *F. tularensis* 15 НИИЭГ). Далее биомodelей поделили на 4 опытные и одну контрольную группы (по 25 особей).

В качестве контрольных (V группа) животных использовали интактных белых мышей. Биомodelям I опытной группы вводили вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ в дозе 10^3 КОЕ на особь, II группе – 10^4 КОЕ, III – 10^3 КОЕ совместно с исследуемым препаратом в дозе 2,5 мг/кг живого веса, IV – 10^4 КОЕ в сочетании с препаратом 974zh. Наблюдения осуществлялись на протяжении 21 суток.

Для иммунизации следующих опытных групп экспериментальных животных использовали вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ. I опытной группе животных вводили *F. tularensis* 15 в дозе 2 КОЕ на особь, II группе – 5 КОЕ, III – 2 КОЕ с исследуемым препаратом (2,5 мг/кг), IV – 5 КОЕ и препарат 974zh.

Наблюдения осуществляли на протяжении 21 суток. Белых мышей из эксперимента выводили гуманным способом. Забор биологического материала проводили на 1, 3, 7, 14 и 21 сутки. Селезенку подвергали гомогенизации (растиранию). Кровь использовали цельную. Относительную концентрацию (ОК) экспрессии генов *TLR* выражали в условных единицах (у.е.). Результаты считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Установлено, что селенорганическое соединение 974zh индуцирует повышение экспрессии генов *TLR2* в крови на 1 сутки с последующим увеличением к 3 и 7 сут, а в селезенке на 3 и 14 сутки при введении данного препарата совместно с вакцинным штаммом *Y. pestis* EV в дозе на порядок ниже от общепринятой, т.е. 10^3 КОЕ. Так, в III группе животных относительная концентрация *TLR2* в крови составила на 1 сутки исследования 12,8 у.е., на 3 – 37,9 у.е., на 7 – 25 у.е. Таким образом, медианные значения ОК *TLR2* в клетках крови были выше значений I группы в 2,8 раза ($p < 0,05$) на 1 сутки исследования, в 12,3 ($p < 0,05$) – на 3 – в 22,7 ($p < 0,05$) раза больше, чем на 7 сутки. Значение медианны у III группы было в 2,1 раза ($p < 0,05$) больше на 1 сутки и в 7,1 раза ($p < 0,05$) – на 3 сутки по сравнению с II группой. Кроме того уровень экспрессии генов *TLR2* у животных III группы статистически значительно возрастал по сравнению с экспрессией в IV группе и был в 2,8 раза ($p < 0,05$) выше на 1 сутки, в 11,6 раза ($p < 0,05$) – 3, в 13,2 раза ($p < 0,05$) – 7 и в 2,8 раза ($p < 0,05$) – 14 сутки исследования. В клетках крови животных I группы экспрессия данного типа Toll-подобного рецептора не увеличивалась и была ниже, чем в остальных группах экспериментальных животных (табл. 8).

ТАБЛИЦА 8

Относительная концентрация экспрессии генов *TLR2* в клетках крови белых мышей, Me (Q1–Q2), у.е.

Сутки	Препарат, доза				
	<i>Y. pestis</i> EV 10^3 КОЕ	<i>Y. pestis</i> EV 10^4 КОЕ	<i>Y. pestis</i> EV 10^3 КОЕ + 974zh	<i>Y. pestis</i> EV 10^4 КОЕ + 974zh	Контроль
1	4,5 (1,4–7,5)	6,2 (4,5–6,6)	12,8* (9,5–16)	4,5 (3,4–7,2)	6,6 (5,4–7,1)
3	3,1 (3,1–3,2)	5,4 (4,2–19,1)	37,9* (36,0–39,0)	3,3 (1,9–4,6)	6,3 (3,7–9,1)
7	1,1 (1,0–1,7)	23 (17,0–29,0)	25* (19,5–39,0)	1,9 (1,3–2,8)	5,8 (3,6–7,7)
14	3,7 (3,0–4,3)	3,8 (3,3–4,3)	4,1 (3,1–5,0)	1,5 (1,2–1,8)	6,5 (5,5–7,6)
21	4,1* (4,1–4,2)	3,8 (1,8–4,1)	4,3 (2,0–4,4)	4,9 (4,9–5,0)	6,3 (5,4–7,0)

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой III

В клетках селезенки белых мышей III группы ОК экспрессии генов TLR2 была существенно выше по сравнению с этим же показателем в других опытных группах и контроле. На 3 сутки ОК была равна 947 у.е., что в 4,7 ($p < 0,05$) раза выше, чем в I группе, в 1,7 раза ($p < 0,05$) выше, чем во II группы и в 155,2 раза ($p < 0,05$) – в IV группе. На 14 сутки наблюдений ОК III группы равнялась 501,1 у.е. и была статистически значимо выше этого же показателя во всех остальных группах экспериментальных животных (табл. 9).

Таблица 9

Относительная концентрация экспрессии генов TLR2 в клетках селезенки белых мышей, Ме (Q1–Q2), у.е.

Сутки	Препарат, доза				
	<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ	<i>Y. pestis</i> EV 10 ⁴ КОЕ	<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ + 974zh	<i>Y. pestis</i> EV 10 ⁴ КОЕ + 974zh	Контроль
1	450,0 (175,0–375,0)	395,0 (330,0–828,0)	501,0 (258,0–647,5)	475,0 (350,0–521,0)	2,2* (1,95–2,7)
3	200,0* (153,0–290,1)	549,0* (474,5–587,0)	947,0* (657,0–1237,0)	6,1* (2,8–9,5)	1,2* (1,1–1,3)
7	45,0 (35,0–51,7)	56,9 (51,3–61,9)	51,4 (25,6–108,4)	55,0 (40,0–108,4)	3,5 (3,0–4,1)
14	122,0* (105,0–139,0)	132,0* (121,0–141,2)	501,1* (247,0–755,2)	2,0* (1,9–2,9)	4,0* (2,8–5,7)
21	3,3 (2,9–3,4)	2,8 (2,4–2,9)	3,1 (2,9–3,3)	2,2 (1,7–2,8)	3,7 (2,8–4,3)

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой III.

Уровень экспрессии генов TLR4 в крови экспериментальных животных, иммунизированных *Y. pestis* EV (10³ КОЕ) в сочетании с селенорганическим соединением (III группа), был статистически значимо выше в 5,5 раза ($p < 0,05$) экспрессии генов данного типа Toll-подобного рецептора у животных, которым вводили только вакцинный штамм *Y. pestis* EV в дозе 10⁴ КОЕ (II группа) и в 2,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с мышами, иммунизированными *Y. pestis* EV в дозе 10⁴ КОЕ совместно с препаратом 974zh (IV группа) на 1 сутки наблюдений. Статистически значимое увеличение показателей ме-

дианы ОК экспрессии генов *TLR4* наблюдалось на 7 сутки в пробах крови III группы в отношении I группы и было выше на 3,9 раза ($p < 0,05$). В других случаях достоверного повышения экспрессии не возникало. На 3, 14, 21 сутки достоверного повышения относительной концентрации экспрессии генов *TLR4* в клетках крови не отмечалось (табл. 10).

Таблица 10

Относительная концентрация экспрессии генов *TLR4* в клетках крови белых мышей, *Me* (Q1–Q2), у.е.

Сутки	Препарат				
	<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ	<i>Y. pestis</i> EV 10 ⁴ КОЕ	<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ + 974zh	<i>Y. pestis</i> EV 10 ⁴ КОЕ + 974zh	Контроль
1	0,0 (0,0–0,0)	1,1* (1,0–1,3)	6,0 (5,4–7,1)	2,5* (1,6–4,9)	1,1* (1,0–1,2)
3	2,1 (1,5–3,1)	2,1 (1,6–2,7)	2,1 (1,6–2,6)	2,0 (1,5–2,6)	3,6 (1,9–5,4)
7	3,9* (3,4–4,3)	14,7* (14,2–15,0)	15,3 (12,7–18,3)	14,1* (14,0–14,3)	5,4* (4,2–6,5)
14	2,1 (2,0–2,2)	1,9 (1,8–2,0)	2,0 (1,9–2,1)	2,0 (1,9–2,1)	2,5 (2,4–2,6)
21	2,2 (2,1–2,3)	2,0 (1,9–2,14,1)	2,1 (1,9–4,4)	2,4 (2,3–2,5)	2,3 (2,2–2,5)

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой III.

Введение биомоделям экспериментального препарата 974zh в комплексе с *Y. pestis* EV в дозе 10³ КОЕ (III группа) вызывало повышение экспрессии генов *TLR* в клетках селезенки. На первые сутки наблюдалось увеличение концентрации по сравнению с V (контрольная) и II группами, где белым мышам был введен только вакцинный штамм *Y. pestis* EV в дозе 10⁴ КОЕ. По сравнению с другими экспериментальными группами на 1 сутки экспрессия *TLR4* была ниже. Селенорганический препарат индуцировал экспрессию генов *TLR4* на 3 и 14 сутки. Относительная концентрация экспрессии генов в III группе на 3 сутки составляла 1500 у.е., что в 17,8 раза ($p < 0,05$) выше концентрации в I группе, в 2,3 раза ($p < 0,05$) выше, чем во II

группе и в 256,4 раза ($p < 0,05$), чем в IV группе. На 14 сутки уровень экспрессии генов *TLR4* в клетках селезенки животных III группы также был статистически значимо выше, чем в I, II и IV группах в 133,7; 4,5 и 283,8 раза соответственно. На 7 и 21 сутки достоверных различий между медианными значениями экспрессии генов *TLR4* типа у группы биомоделей, иммунизированных *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ с 974zh, с другими опытными группами не регистрировалось (табл. 11).

Таблица 11

Относительная концентрация экспрессии генов *TLR-4* в клетках селезенки белых мышей, Ме (Q1–Q2), у.е.

Сутки	Препарат, доза				
	<i>Y. pestis</i> EV 10^3 КОЕ	<i>Y. pestis</i> EV 10^4 КОЕ	<i>Y. pestis</i> EV 10^3 КОЕ) + 974zh	<i>Y. pestis</i> EV 10^4 КОЕ + 974zh	Контроль
1	1910,0* (1580,0-1973,0)	45,0** (42,5-47,6)	985,0 (887,5-1028,0)	1277,0* (850,0-1461,0)	165,0* (125,0-2212,5)
3	84,1** (79,0-90,3)	665,0* (592,5-705,5)	1500,0 (1325,0-1512,5)	5,9** (4,5-7,3)	2,0** (1,0-3,1)
7	57,1 (49,4-69,5)	55,0 (39,0-58,6)	60,0 (39,1-68,4)	54,9 (39,0-58,6)	4,5** (3,8-4,9)
14	8,5** (7,8-9,3)	250,0* (198,0-281,1)	1135,0 (1100,0-1170,5)	4,0** (2,5-6,1)	4,0** (2,5-6,1)
21	45,1 (45,0-45,2)	48,3 (46,7-49,2)	51,0 (49,4-52,1)	49,9 (46,7-49,9)	4,3* (23,7-4,9)

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$ по сравнению с группой III.

В ходе исследования установлено, что совместное введение вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 2 КОЕ и соединение 974zh (III группа) индуцирует повышение уровня экспрессии генов *TLR2* в клетках крови только на 1 сутки, в клетках селезенки – на 1 и 3 сутки. В другие сроки исследования статистически значимых изменений не отмечалось. Так, медиальные значения ОК экспрессии

генов *TLR2* в клетках крови III группы были достоверно больше концентрации I, II и IV групп в 1,7, 1,7 и 1,6 раза ($p < 0,05$) соответственно (табл. 12).

Таблица 12

Относительная концентрация экспрессии генов *TLR2* в клетках крови белых мышей, Ме (Q1–Q2), у.е.

Сутки	Препарат, доза				
	<i>F. tularensis</i> 15 2 КОЕ	<i>F. tularensis</i> 15 5 КОЕ	<i>F. tularensis</i> 15 2 КОЕ + 974zh	<i>F. tularensis</i> 15 5 КОЕ + 974zh	Контроль
1	9,1* (7,7–9,9)	9,1* (8,1–9,6)	15,7 (11,7–19,1)	9,7* (9,5–9,8)	1,5* (1,3–1,6)
3	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
7	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
14	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
21	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой III.

В клетках селезенки белых мышей III группы уровень ОК экспрессии данного типа Toll-подобного рецептора на 1 сутки был выше значений I группы в 18,5, II – в 4,2 и IV – в 5,9 раза ($p < 0,05$). Введение экспериментальным животным *Francisella tularensis* 15 (2 КОЕ) и препарата 974zh также вызывало повышение уровня экспрессии в 177,2 и 21,6 раза ($p < 0,05$) больше, чем в I, II и IV группах на 3 сутки исследования соответственно (табл. 13).

Относительная концентрация *TLR4* в клетках крови при введении животным туляреминой вакцины в дозе 2 КОЕ и селенорганического препарата одновременно (III группа) была выше только на 1 сутки и составляли 6,4 у.е., что в 3,6 раза ($p < 0,05$) выше, чем при иммунизации только *F. tularensis* 15 в дозе 2 КОЕ (табл. 14).

Таблица 13

Относительная концентрация экспрессии генов TLR2 в клетках селезенки белых мышей, Ме (Q1–Q2), у.е.

Сутки	Препарат, доза				
	<i>F. tularensis</i> 15 2 КОЕ	<i>F. tularensis</i> 15 5 КОЕ	<i>F. tularensis</i> 15 2 КОЕ + 974zh	<i>F. tularensis</i> 15 5 КОЕ + 974zh	Контроль
1	95,3** (75,3–109,1)	423,4* (422,2–425,5)	1761,0 (970,0–2551,0)	300,5* (250,0–489,8)	2,1** (1,3–2,8)
3	34,0** (24,3–43,7)	2998,0* (2946,8–3050,0)	6020,0 (5948,0–8060,0)	278,5* (227,8–329,3)	2,0** (1,6–12,4)
7	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
14	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
21	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$ по сравнению с группой III.

Таблица 14

Относительная концентрация TLR4 в клетках крови белых мышей, Ме (Q1–Q2), у.е.

Сутки	Препарат, доза				
	<i>F. tularensis</i> 15 2 КОЕ	<i>F. tularensis</i> 15 5 КОЕ	<i>F. tularensis</i> 15 2 КОЕ + 974zh	<i>F. tularensis</i> 15 5 КОЕ + 974zh	Контроль
1	1,8* (1,5–2,1)	5,9 (4,6–6,7)	6,4 (4,7–7,9)	6,0 (5,8–6,2)	4,1* (4,0–4,2)
3	4,3 (3,6–4,8)	3,8 (2,4–4,6)	4,0 (3,3–4,1)	4,3 (3,6–4,8)	4,1 (4,0–4,2)
7	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
14	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
21	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой III.

Достоверное увеличение значения медианы относительной концентрации *TLR4* в клетках селезенки III группы отмечалось только на 1 и 3 сутки, в другие сроки исследования достоверных изменений не наблюдалось. Таким образом, экспрессия генов Toll-подобного рецептора 4 типа в группе биомodelей, иммунизированных *F. tularensis* 15 (2 КОЕ) в сочетании с препаратом 974zh (III группа), была выше, чем у групп животных, которым вводили только вакцинный штамм в дозе 2 КОЕ (I группа), в дозе 5 КОЕ (II группа) и *F. tularensis* 15 в дозе 5 КОЕ совместно с препаратом 974zh (IV группа).

Медианные значения относительной концентрации экспрессии генов *TLR4* в пробах III группы на 1 сутки были выше в 53,4 раза ($p < 0,05$), чем в I группе, а также в 18,5 ($p < 0,05$) – II группе и в 5,3 раза ($p < 0,05$) – IV группе экспериментальных животных. На 3 сутки исследований уровень экспрессии генов Toll-подобного рецептора данного типа в клетках селезенки III группы был статистически значимо выше, чем в других опытных группах (табл. 15).

ТАБЛИЦА 15

Относительная концентрация *TLR4* в клетках селезенки белых мышей, Me (Q1–Q2), у.е.

Сутки	Препарат, доза				
	<i>F. tularensis</i> 15 2 КОЕ	<i>F. tularensis</i> 15 5 КОЕ	<i>F. tularensis</i> 15 2 КОЕ + 974zh	<i>F. tularensis</i> 15 5 КОЕ + 974zh	Контроль
1	28,8** (15,5–31,2)	82,8** (81,8–85,3)	1535,0 (1306,0–1764,0)	289,0* (224,0–829,0)	54,4** (54,2–54,6)
3	2507,0 (2085,0–2678,0)	3385,0 (2180,0–4920,0)	3195,0 (2990,0–3468,0)	198,1** (138,0–231,0)	53,8** (51,2–58,4)
7	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
14	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
21	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$ по сравнению с группой III.

Таким образом, выявленные особенности экспрессии генов *TLR2*, *TLR4* в клетках врожденного иммунитета биомodelей в ответ на введение штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ и *F. tularensis* 15 НИИЭГ по уровню и кинетике зависят от количества вводимого антигена (КОЕ) вакцинных штаммов и наличия или отсутствия вводимого препарата 974zh. Данное экспериментальное селенорганическое соединение индуцирует повышение экспрессии генов *TLR2* при совместном введении с *Y. pestis* EV в дозе на порядок ниже от общепринятой (10^3 КОЕ) на 1, 3 и 7 сутки наблюдения в клетках крови, на 3 и 14 сутки в клетках селезенки.

При введении селенорганического препарата в сочетании со сниженной дозой *F. tularensis* 15 (2 КОЕ) препарат вызывает повышение экспрессии генов *TLR2* в клетках крови только на первые сутки и в клетках селезенки на 1 и 3 сутки наблюдения. В ответ на введение экспериментальным биомodelям препарата 974zh с вакцинным штаммом *Y. pestis* EV зарегистрировано повышение экспрессии *TLR4* клетками крови на 1 и 7 сутки, в клетках селезенки – на 1, 3 и 14 сутки эксперимента. Сочетанное применение селенорганического соединения и *F. tularensis* 15 индуцировало увеличение экспрессии генов Toll-подобного рецептора 4 типа в клетках крови на 1 сутки, в клетках селезенки – на 1 и 3 сутки.

Исследования показали, что при введении синтетического селенорганического соединения в сочетании с вакцинным штаммом *Y. pestis* EV при снижении иммунизирующей дозы до 10^3 , происходит усиление экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в клетках крови и селезенки биомodelей практически во все сроки наблюдения.

Так как при вакцинации *F. tularensis* 15 совместно с препаратом 974zh увеличение экспрессии Toll-подобных рецепторов 2 и 4 типа отмечалось только на 1 сутки в клетках крови и на 1 и 3 сутки в клетках селезенки, необходимы дальнейшие исследования для полного понимания механизмов и влияния экспериментального соединения на данные рецепторы при вакцинации туляремиям штаммом.

2.8. Влияния селеноорганического соединения 974zh на динамику показателей иммунокомпетентных клеток крови белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *Y. pestis* EV

На следующем этапе исследований нами проведена оценка влияния данного препарата в дозе 2 мг/кг на динамику показателей иммунокомпетентных клеток крови белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *Y. pestis* EV в дозах 10^3 и 10^4 КОЕ, методом проточной цитофлуориметрии.

Материалом для исследования служила гепаринизированная кровь 100 беспородных белых мышей обоих полов (18–20 г), которую получали по стандартной методике после вывода животных из эксперимента в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях (22.09.2010 г.), ГОСТ 34088-2017 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными; ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

Экспериментальные животные были разделены на 5 групп: группа 1 – 10^4 КОЕ *Y. pestis* EV, группа 2 – 10^4 КОЕ в сочетании с 974zh, группа 3 – 10^3 КОЕ, группа 4 – 10^3 КОЕ в сочетании с 974zh и группа 5 – контроль. Анализ образцов и учет результатов проводили на 3, 7, 14 и 21 сутки.

Иммунофенотипирование клеток крови проводили по стандартной методике на цитофлуориметре BD FACS Canto™ II в программе BD Diva 6.0. Фенотип лимфоцитов определяли с использованием моноклональных антител (МКАт, Becton Dickinson, США) к маркерам CD45, CD44, CD3, CD19, CD4, CD8, CD25, CD62L, I-A/I-E (МНС II).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью непараметрических методов анализа в пакете прикладных программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианы и межквартильных диапазонов (Me (IQR) %).

При анализе показателей клеточного иммунитета у белых мышей группы 4 (*Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ совместно с 974zh) отмечалось статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение процентного содержания моноцитов (3,5 (2,8–4,4) %) на 7 сутки в 1,7 раза и снижение лимфоцитов на 3 сутки (62,3 (55,5–65,4) %) в 1,2 раза по сравнению с мышами

группы 3 (2,1 (1,7–2,7) %) и (70,0 (69,3–76,2) %) соответственно. При использовании вакцинного штамма в дозе 10^4 КОЕ (группа 1), так и при его сочетании с 974zh (группа 2) зарегистрировано аналогичное изменение данных популяций на 7 сутки наблюдения, которое было на уровне значений, наблюдаемых у животных группы 4 (рис. 40).

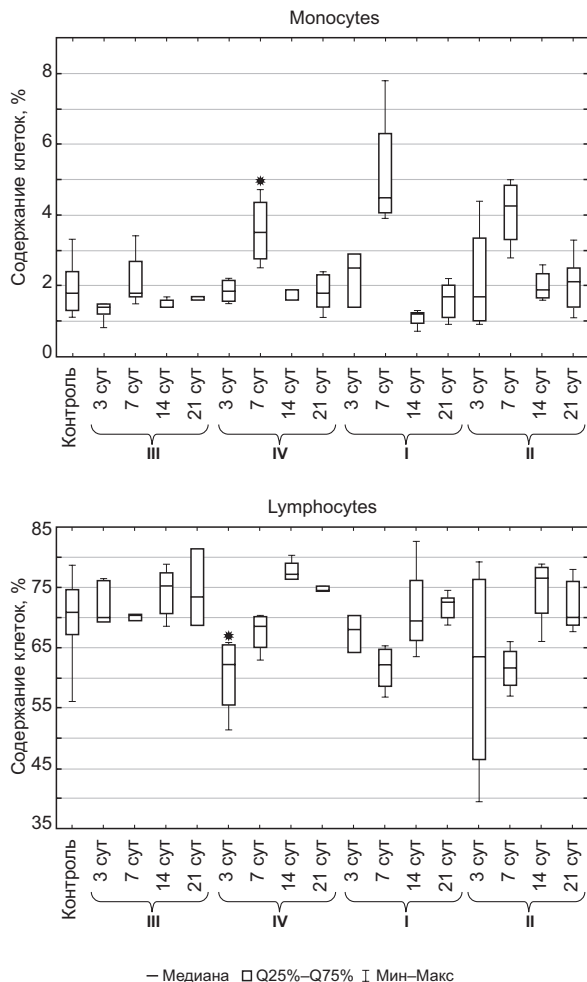


Рис. 40. Динамика содержания моноцитов и лимфоцитов в крови экспериментальных животных в зависимости от состава инокулята на разных сроках эксперимента с иммунизацией в разных дозах и при сочетанном введении с 974zh. I – *Y. pestis* EV в дозе 10^4 КОЕ, II – *Y. pestis* EV в дозе 10^4 КОЕ совместно с 974zh, III – *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ, IV – *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ совместно с 974zh; * – $p < 0,05$.

Статистически значимых различий содержания В-лимфоцитов, общей популяции Т-лимфоцитов, хелперных и цитотоксических Т-клеток между исследуемыми группами не отмечено. Тем не менее, на 3 сутки эксперимента выявлена тенденция ($1 > p > 0,05$) к снижению В-лимфоцитов и повышению Т-лимфоцитов у экспериментальных животных группы 1 и 3.

При изучении экспрессии молекул адгезии CD44 и CD62L, дифференцирующих Т-лимфоциты мышей на клетки памяти и наивные лимфоциты, установлено статистически достоверное снижение популяции Т-лимфоцитов памяти ($CD3^+CD44^+CD62L^-$) на 3 сутки в группе 4 в 1,7 раза (4,7 (4,2–5,6) %, $p = 0,0089$) по сравнению с контрольной группой – 8,1 (6,7–9,0) %. Содержание популяции наивных Т-клеток ($CD3^+CD44^-CD62L^+$) достоверно ниже на 21 сутки в группе 4 (77,9 (64,6–78,1) %, $p = 0,0120$) по сравнению с показателями крови экспериментальных животных группы 2 – 83,2 (80,3–83,5) % (рис. 41).

Изменений содержания наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти среди $CD8^+$ -клеток не обнаружено. Выявлено достоверное снижение $CD3^+CD4^+CD8^-CD44^+CD62L^-$ -клеток на 3 сутки при введении дозы вакцинного штамма *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ совместно с 974zh (3,9 (3,7–4,6) %, $p = 0,0295$) по сравнению с контролем (6,4 (4,5–6,9) %). У животных экспериментальной группы 2 регистрировалось статистически значимое повышение содержания этих клеток на 14 сутки в 1,3 раза (8,2 (7,4–10,6) %) по сравнению с контролем.

При изучении динамики содержания циркулирующих активированных хелперных Т-лимфоцитов на протяжении 14 дней установлено снижение $CD3^+CD4^+CD8^-CD25^+$ -клеток в среднем в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными (1,7 (1,5–2,7) %) независимо от дозы штамма *Y. pestis* EV (группы 1 и 3), что также наблюдается у мышей группы 2 (рис. 42).

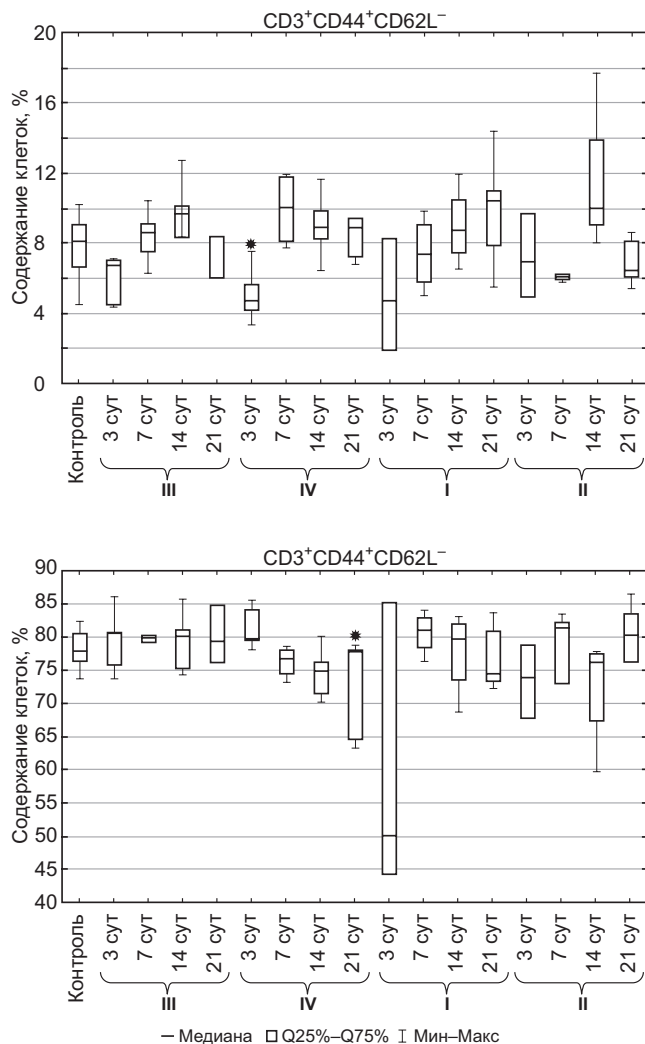


Рис. 41. Содержание Т-лимфоцитов памяти и Т-наивных клеток по экспрессии молекул адгезии CD44 и CD62L. I – *Y. pestis* EV в дозе 10^4 КОЕ, II – *Y. pestis* EV в дозе 10^4 КОЕ совместно с 974zh, III – *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ, IV – *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ совместно с 974zh; * – $p < 0,05$.

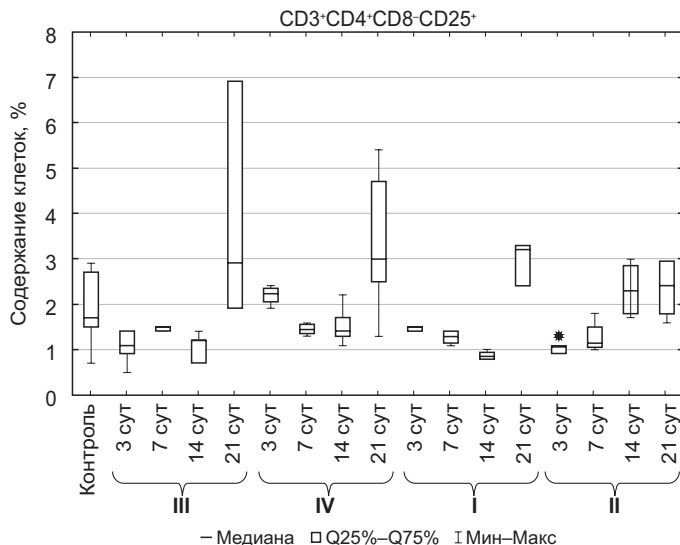


Рис. 42. Динамика содержания циркулирующих CD25⁺-активированных хелперных Т-лимфоцитов. I – *Y. pestis* EV в дозе 10⁴ КОЕ, II – *Y. pestis* EV в дозе 10⁴ КОЕ совместно с 974zh, III – *Y. pestis* EV в дозе 10³ КОЕ, IV – *Y. pestis* EV в дозе 10³ КОЕ совместно с 974zh; * – $p < 0,05$.

При введении 1000 м.к. *Y. pestis* EV с селеноорганическим препаратом данного снижения не наблюдалось. Содержание CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25⁺-клеток на 3 сутки у животных группы 2 (1,05 (0,9–1,1) %) было в 2,1 раза ниже по сравнению с группой 4 (2,25 (2,05–2,35) %), связанной с повышенной бактериальной нагрузкой.

Активированные CD25⁺ Т-хелперные лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD44⁺CD62L⁻CD25⁺ и CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD44⁻CD62L⁺CD25⁺ достоверно снижаются в 3,4 и 1,6 раза на 3 сутки во всех исследуемых группах ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными (2,2 (1,6–2,6) % и 19,5 (15,7–22,3) % соответственно). Обращает на себя внимание увеличение содержания активированных наивных Т-хелперных клеток у мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV, на 14 сутки наблюдения независимо от дозы (рис. 43).

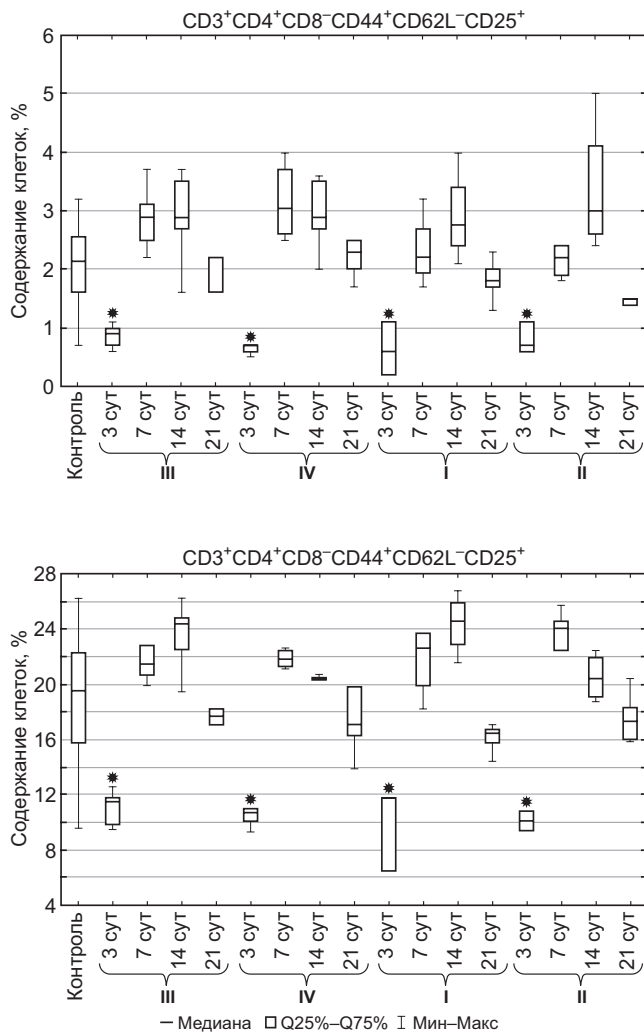


Рис. 43. Экспрессия маркера активации CD25 на Т-лимфоцитах с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD44⁺CD62L⁻ и CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD44⁺CD62L⁺. I – *Y. pestis* EV в дозе 10⁴ КОЕ, II – *Y. pestis* EV в дозе 10⁴ КОЕ совместно с 974zh, III – *Y. pestis* EV в дозе 10³ КОЕ, IV – *Y. pestis* EV в дозе 10³ КОЕ совместно с 974zh; * – $p < 0,05$

В то же время, при сочетанном введении *Y. pestis* EV с 974zh зарегистрировано увеличение хелперных Т-лимфоцитов памяти, экспрессирующих маркер активации CD25⁺: группа 2 – на 14 сутки,

группа 4 – на 7 сутки в среднем в 1,4 раза по сравнению со значениями группы 5 ($p < 0,05$).

Таким образом, в результате проведенного исследования продемонстрировано иммуномодулирующее влияние селеноорганического препарата синтетического происхождения (974zh), которые сохранялись при снижении дозы вакцинного штамма *Y. pestis* EV с 10^4 до 10^3 КОЕ. В связи с тем, что у экспериментальных животных, иммунизированных *Y. pestis* EV в дозах 10^4 КОЕ и 10^3 КОЕ в сочетании с 974zh, существенных различий исследуемых показателей не выявлено, целесообразно рекомендовать применение иммунизирующей дозы 10^3 КОЕ с целью минимизации бактериальной нагрузки. Однако для дальнейшего понимания особенностей иммуномодулирующих свойств селеноорганического препарата 974zh необходимы дополнительные исследования.

2.9. Действие препарата 974zh на протективные свойства вакцинных штаммов

При оценки действия препарата 974zh на иммуногенную активность вакцинного штамма *Y. pestis* EV установлено, что данный препарат в дозе 2,5 мг/кг повышает протективные свойства вакцинного штамма *Y. pestis* EV, при снижении иммунизирующей дозы на порядок (от 10^4 до 10^3 КОЕ). Продолжительность жизни после заражения вирулентным штаммом в группе животных, иммунизированных *Y. pestis* EV в низкой дозе (10^3 КОЕ) совместно с препаратом 974zh (2,5 мг/кг), введенным двукратно (1 и на 7 сутки) составила 15 суток и превышала продолжительность жизни животных, иммунизированных только *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ более чем в полтора раза. Кроме того, исследуемый препарат 974zh индуцировал снижение соотношения цАМФ/цГМФ в тимусе и селезенке экспериментальных животных, что свидетельствует о повышении пролиферативного потенциала клеток иммунокомпетентных органов. Очевидно, что соединение 974zh в дозе 2,5 мг/кг способно повышать иммуногенную и протективную активность живой противочумной вакцины. Вместе с тем, вероятно, целесообразно формировать тенденцию к снижению дозы селенсодержащего препарата, привнесенного в вакцинальный процесс.

Целью исследований в рамках данного этапа является определение оптимальной дозы синтетического селенорганического соединения 974zh для повышения иммуногенной и протективной активности *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ (на порядок ниже эталонной – 10^4 КОЕ).

В работе использовали 206 сертифицированных белых мышей. Животных иммунизировали подкожно в область правого бедра, а препарат вводили тем же способом в область левого бедра. Лабораторных животных разделили на 7 групп: I контрольной вводили в правое бедро 0,9% NaCl (физиологический раствор); II – *Y. pestis* EV в дозе 10^4 КОЕ; III – *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ; IV – *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ + 974zh в расчете 1,0 мг/кг веса животного (1 и на 5 сутки); V – *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ + 974zh 1,5 мг/кг; VI – *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ + 974zh 2,0 мг/кг; VII – *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ + 974zh 2,5 мг/кг. Через 21 сутки после иммунизации животных заражали вирулентным референтным штаммом *Y. pestis* 3560 (дозой LD₅₀ – 100 КОЕ). Наблюдение проводили на протяжении 21 суток. По окончании эксперимента рассчитывали показатель протективности (ПВЖ – процент выживших животных после их заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 3560).

Группу лабораторных мышей иммунизировали *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ, что на порядок ниже, чем доза, которая нами была установлена ранее при экспериментальных исследованиях (*Y. pestis* EV в дозе 10^4 КОЕ). После заражения вирулентным штаммом протективность в этой группе составила 60 % (табл. 16). Исследуемый показатель снизился в 1,7 раза. Для сравнения, показатель протективности (ПП) у животных, иммунизированных *Y. pestis* EV в стандартной дозе 10^4 КОЕ составил 100 %. Очевидно, что десятикратное уменьшение иммунизирующей дозы *Y. pestis* EV привело к снижению протективной активности живой противочумной вакцины.

Таблица 16

Оценка протективных свойств *Y. pestis* EV в сочетании с препаратом 974zh

Инокулят, введённый белым мышам	Кол-во зараженных животных	Кол-во выживших животных	ПП, %
<i>Y. pestis</i> EV 10 ⁴ КОЕ	10	10	100
<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ	10	6	60
<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ + 974zh 1,0 мг/кг	10	6	60
<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ + 974zh 1,5 мг/кг	10	7	70
<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ + 974zh 2,0 мг/кг	12	11	91,7
<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ + 974zh 2,5 мг/кг	12	11	91,7
Контроль	12	0	-

Лабораторных мышей иммунизировали *Y. pestis* EV в дозе 10³ КОЕ совместно с двукратным введением синтетического селеноорганического препарата 974zh на 1 и 5 сутки в дозах: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мг/кг (табл. 16). Минимальная доза препарата 974zh (1,0 мг/кг) практически не влияла на протективную активность вакцинного штамма *Y. pestis* EV 10³ КОЕ, поскольку их ПП составил 60 %. В дозе 1,5 мг/кг исследуемый препарат, введенный совместно с *Y. pestis* EV 10³ КОЕ, повышал ПП до 70 %. Введение 2,0 мг/кг 974zh повышало исследуемый показатель иммунизированных *Y. pestis* EV 10³ КОЕ животных до 90 %. Повышение дозы препарата до 2,5 мг/кг не влияло на дальнейшее повышение протективной активности *Y. pestis* EV 10³ КОЕ.

Показатель протективности после заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 3560 белых лабораторных мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV 10³ КОЕ совместно с синтетическим селеноорганическим препаратом 974zh, представлена в таблице 16.

Таким образом, синтетический селенорганический препарат 974zh повышает иммуногенную и протективную активность живой противочумной вакцины *Y. pestis* EV 10³ КОЕ. Из исследованного диапазона выявлена оптимальная доза 2,0 мг/кг, которая позволяет снизить дозу вакцины с 10⁴ до 10³ КОЕ.

Для оптимизации сроков двукратного введения препарата 974zh ранее были проведены исследования (1–21 сутки), которые показали, что оптимальными сроками для повторной инокуляции препарата являются 5–7 сутки. В связи с тем, что результаты исследований на 5, 6 и 7 сутки статистически сопоставимы, в работе использовали 5 сутки для повторного введения препарата 974zh.

Для введения препарата 974zh готовили его раствор в 3ФР в концентрации 5 мг/50 мл. Животным каждой группы вводили объем раствора, содержащий эквивалент выбранной дозы.

Минимальная доза препарата 974zh (1,0 мг/кг) практически не влияла на протективную активность вакцинного штамма *Y. pestis* EV 10³ КОЕ, поскольку их ПП составил 70 %. В дозе 1,5 мг/кг исследуемый препарат, введенный совместно с *Y. pestis* EV 10³ КОЕ, повышает ПП до 80 %. Введение 2,0 мг/кг 974zh повышает исследуемый показатель иммунизированных *Y. pestis* EV 10³ КОЕ животных до 91,7 % при повторном введении 974zh на 3 сутки и до 100 % при повторном введении этого препарата на 5 сутки. Увеличение дозы препарата до 2,5 мг/кг не влияло на дальнейшее повышение протективной активности *Y. pestis* EV 10³ КОЕ.

Показатель протективности после заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 3560 белых лабораторных мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV 10³ КОЕ совместно с синтетическим селеноорганическим препаратом 974zh, представлена в таблице 17.

Сочетанное применение вакцинного штамма в дозе 10³ КОЕ (т.е. при снижении иммунизирующей дозы в 1000 раз по сравнению с 10⁶ КОЕ) с препаратом 974zh повышает ее иммуногенные (протективные) свойства в модельных опытах по заражению белых мышей вирулентным штаммом *Y. pestis* 3560 в дозе 200 DCL (протективность 91,7 %). Дополнительное введение препарата 974zh на 5 сутки после иммунизации существенно повышает защитный эффект аттенуированного чумного микроба при заражении экспери-

ментальных животных вирулентным штаммом *Y. pestis* (протективность составляет 100 %).

ТАБЛИЦА 17

Показатель протективности *Y. pestis* EV

Иммунизированные животные	Первое введение 974zh / второе введение, сутки	Кол-во зараженных животных	Кол-во выживших животных	ПП, %
<i>Y. pestis</i> EV 10 ⁴ КОЕ	–	10	10	100
<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ	–	10	6	60
<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ + 974zh 1,0 мг/кг	1/5	10	7	70
<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ + 974zh 1,5 мг/кг	1/5	10	8	80
<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ + 974zh 2,0 мг/кг	1/3	10	9	90
	1/5	10	10	100
	1/7	10	10	100
	1/14	10	9	90
<i>Y. pestis</i> EV 10 ³ КОЕ + 974zh 2,5 мг/кг	1/3	10	9	90
	1/5	10	10	100
	1/7	10	10	100
	1/14	10	9	90
Контроль	–	10	0	–

Таким образом, снижение иммунизирующей дозы *Y. pestis* EV с 10⁶ до 10³ КОЕ при сочетанном применении препарата 974zh повышает протективную активность вакцинного штамма на 1,1 %, а его дополнительное введение на 5 сутки после иммунизации повышает его защитный эффект живой чумной вакцины EV при заражении экспериментальных животных вирулентным штаммом *Y. pestis* 3560 (протективность составляет 100 %).

Сочетанное применение живой чумной вакцины EV в дозе 10^3 КОЕ с препаратом 974zh повышает ее иммуногенные (протективные) свойства в модельных опытах по заражению белых мышей (протективность 91,7 %). Также показано, что препарат 974zh повышает протективные свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 ($\text{ImD}_{50} - 2$ КОЕ) и *B. anthracis* Sterne 34F₂ ($\text{ImD}_{50} - 100$ спор) при инфицировании мышей вирулентными штаммами (протективность составляет 98,5 и 69,7 % соответственно). Дополнительное введение данного препарата на 5 сутки после иммунизации существенно повышает защитный эффект вакцин при заражении экспериментальных животных вирулентными штаммами (протективность составляет 100 %).

Данный способ повышения иммуногенных и протективных свойств вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИИЭГ можно использовать при проведении экспериментальных исследований по изучению пато- и иммуногенеза чумы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди иммуноадьювантов, способных повышать эффективность формирования продолжительного иммунитета, особое место занимают селенорганические соединения, которые обладают иммунотропными свойствами и могут повышать антиоксидантный потенциал организма, а также оказывать антидистрофический эффект и противоаллергическое действие. Исследовано пять нетоксичных для лабораторных животных природных и синтетических селенсодержащих соединений, синтезированных в лаборатории халькогенорганических соединений Иркутского института химии имени А.Е. Фаворского СО РАН, иммуномодулирующие свойства которых оценивали в условиях *ex vivo* на суспензии клеток крови и иммунокомпетентных органов экспериментальных животных по показателям индекса стимуляции (продукции цитокинов, цАМФ/цГМФ) до и через месяц после вакцинации.

Результаты комплексной оценки иммуногенных и протективных свойств вакцинных штаммов *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. anthracis* Sterne 34F₂ при сочетанном применении с селенсодержащим препаратом 2,6-дипиридиний-9-селенабицикло[3.3.1]нонандибромида (974zh) продемонстрировали выраженный антиоксидантный эффект с преимущественным влиянием на Т-клеточное звено иммунитета.

Сравнительное изучение действия вакцинных штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ, *B. anthracis* Sterne 34F₂ и *F. tularensis* 15 НИИЭГ и их сочетанное применение с препаратом 974zh выявило различия в реакции иммунной системы биомодели, обусловленные действием селенсодержащего соединения: данный препарат при сочетанном использовании с вакцинными штаммами усиливает у экспериментальных животных реакцию со стороны иммунокомпетентных органов, оказывает антидистрофический эффект, способствует активации иммунного ответа и не оказывает повреждающего действия на ткани макроорганизма; нивелирует негативные эффекты, вызываемые вакцинными штаммами, в печени белых мышей. Сравнительный анализ структурных изменений в надпочечниках при морфометрическом исследовании опытных групп белых мышей указывает на способ-

ность данного препарата снижать стрессовые воздействия живых вакцин на организм экспериментальных животных. Важно отметить, что результаты микроскопического исследования головного мозга не выявили существенных патологических изменений у белых мышей всех исследованных групп. Препарат 974zh снижает токсическое действие исследованных вакцинных штаммов и нивелирует стресс-реакцию клеток головного мозга.

Совместное введение вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, *B. anthracis* Sterne 34F2 и *F. tularensis* 15 НИИЭГ с препаратом 974zh усиливает морфологические изменения в тимусе за счет увеличения объема коркового вещества и пролиферации лимфоидных клеток. Экспериментальное селенсодержащее соединение вызывает усиленную бласттрансформацию в реактивных центрах фолликулов селезенки и лимфатических узлов белых мышей, что приводит к пролиферации плазматических клеток. У экспериментальных животных, иммунизированных вакцинными штаммами в сочетании с селенсодержащим препаратом 974zh по сравнению с группой белых мышей, привитых без иммуномодуляции, выявлена статистически значимая индукция иммунного ответа и формирование пулов антиген-специфичных В- и Т-клеток, которые проявляют свою функциональную активность посредством пролиферации, экспрессии маркеров активации.

Установлено, что штаммы *Y. pestis* EV НИИЭГ в дозе 10^3 КОЕ, *B. anthracis* Sterne 34F₂ (100 спор) и *F. tularensis* 15 НИИЭГ (10^2 КОЕ) индуцируют изменения уровня содержания циклических нуклеотидов в тимусе и селезенке белых мышей. Значения индекса соотношения (ИС) цАМФ/цГМФ в иммунокомпетентных органах имели фазовый или колебательный характер, что, по-видимому, связано с регуляцией поствакцинальной иммунореактивности организма. Селенорганическое соединение 974zh стимулирует ИС цАМФ/цГМФ, что свидетельствует о его стимулирующем действии на иммуногенные свойства вакцинных штаммов при снижении иммунизирующей дозы на порядок по сравнению с исходной.

Оптимизированы условия цитологических исследований клеточного звена иммунитета экспериментальных животных методом флуоресцентной сортировки клеток (FACS-анализ) на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II. Установлено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение моноцитов на 7 сутки в 1,7 раза

(3,5 (2,8–4,4) %) и снижение процентного содержания лимфоцитов на 3 сутки в 1,2 раза 62,3 (55,5 – 65,4) %, соответственно у мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV как в дозе 10^3 КОЕ, так и 10^4 КОЕ в сочетании с 974zh по сравнению с опытной группой, привитых *Y. pestis* EV в той же дозе без препарата (2,1 (1,7–2,7) %). При изучении динамики содержания циркулирующих активированных Т-лимфоцитов установлено снижение $CD3^+CD4^+CD8^-CD25^+$ клеток в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными (1,7 (1,5–2,7) %) независимо от дозы штамма *Y. pestis* EV (10^3 и 10^4 КОЕ). При введении селенорганического препарата с *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ данного снижения не наблюдалось. Вакцинный штамм в дозе 10^4 КОЕ снижает содержание циркулирующих $CD3^+CD4^+CD8^-CD25^+$ клеток на 3 сутки (1,05 (0,9–1,1) %) в 2,1 раза по сравнению с дозой *Y. pestis* EV 10^3 КОЕ (2,25 (2,05–2,35) %), что может быть обусловлено повышенной бактериальной нагрузкой.

Для оценки экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* клетками иммунной системы экспериментальных животных, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ и *F. tularensis* 15 НИИЭГ на фоне иммуномодуляции препаратом 974zh проведен подбор праймеров, а также отработан алгоритм проведения ПЦР-анализа. При оценке адаптивного иммунитета на примере клеток крови и селезенки биомodelей выявлены особенности экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в ответ на введение вакцинных штаммов *Y. pestis* EV и *F. tularensis* 15 по уровню и кинетике, которые зависят от иммунизирующей дозы и наличия или отсутствия вводимого препарата 974zh. Установлено, что данный препарат индуцирует статистически значимое повышение экспрессии гена *TLR2* при совместном введении с *Y. pestis* EV в дозе 10^3 КОЕ на 1, 3 и 7 сутки наблюдения в клетках крови и на 3 и 14 сутки в клетках селезенки. Сочетанное применение *F. tularensis* 15 в дозе 2 КОЕ с препаратом 974zh вызывает повышение экспрессии гена *TLR2* в клетках крови только на первые сутки, а в клетках селезенки на 1 и 3 сутки наблюдения. Зарегистрировано повышение экспрессии *TLR4* клетками селезенки и крови на 1 и 7 сутки после иммунизации живыми вакцинами на фоне иммуномодуляции. Показано, что введение вакцинных штаммов без препарата 974zh не вызывало статистически значимых изменений экспрессии генов исследуемых типов Toll-подобных рецепторов.

Сочетанное применение живой чумной вакцины EV в дозе 10^3 КОЕ с препаратом 974zh повышает ее иммуногенные (протективные) свойства в модельных опытах по заражению белых мышей (протективность 91,7 %). Также показано, что препарат 974zh повышает протективные свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 (ImD₅₀ – 2 КОЕ) и *B. anthracis* Sterne 34F₂ (ImD₅₀ – 100 спор) при инфицировании мышей вирулентными штаммами (протективность составляет 98,5 и 89,7 % соответственно). Дополнительное введение данного препарата на 5 сутки после иммунизации существенно повышает защитный эффект вакцин при заражении экспериментальных животных вирулентными штаммами (протективность составляет 100 %).

Таким образом, в ходе исследований разработан алгоритм подбора и оценки эффективности иммуномодулирующих препаратов для усовершенствования уже имеющихся вакцин или создания на их основе новых препаратов. Продемонстрированы иммуномодулирующие свойства селенорганического соединения 974zh и его влияние на функциональную активность клеток врождённого иммунитета. Разработан способ повышения иммуногенной и протективной активности вакцинного штамма чумного микроба с использованием селенорганического препарата 974zh, что свидетельствует в пользу возможности его использования как стимулятора формирования в организме приобретённого клеточного противочумного иммунитета.

Материалы, полученные в ходе исследования, свидетельствуют о перспективности дальнейшей работы в данном направлении и накопления новых данных о воздействии экспериментального селенсодержащего препарата 974 zh на организм экспериментальных животных.

Результаты исследования формируют основу для совершенствования специфической профилактики опасных инфекционных болезней в условиях возникновения эпидемических осложнений на территориях природных очагов инфекций.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Витязева С.А., Балахонов С.В., Дубровина В.И., Марков Е.Ю., Половинкина В.С. Актуальные вопросы совершенствования специфической профилактики чумы и сибирской язвы // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – № 4(71). – С. 63–66.
2. Иммуномодулирующее действие металлосодержащих нанокмпозитов / под ред. С.В. Балахонова. – Иркутск: Мегалит, 2017. – 75 с.
3. Караулов А.В., Калюжин О.В. Иммунотропные препараты: принципы применения и клиническая эффективность. – М.: МЦФЭР, 2007. – 144 с.
4. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммуномодуляторы: классификация, фармакологическое действие, клиническое применение. – М.: Фармарус Принт, 2005. – 27 с.
5. Андропова Т.М., Пинегин Б.В. Мурамилдипептиды – иммунотропные лекарственные средства нового поколения // Венеролог. – 2006. – № 6. – С. 11–15.
6. Ogawa C., Calabrese F., Grava C., Agostini C., Punzi L., Oliviero F., et al. Muramyl dipeptide and its derivatives: Peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy // Curr. Bioact. Compd. – 2011. – № 7(3). – P. 180–197.
7. Serban C., Dragan S. The relationship between inflammatory and oxidative stress biomarkers, atherosclerosis and rheumatic diseases // Curr. Pharm. Des. – 2014. – № 20(4). – P. 585–600.
8. Афанасьева Г.А. Механизмы индукции и потенцирования системных цитопатогенных эффектов токсинов *Yersinia pestis* и принципы их медикаментозной коррекции: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.00.16. – Саратов, 2009. – 46 с.
9. Земсков А.М., Земсков В.М., Золотодов В.И. Неортодоксальная иммунология. – М.: Триада-Х, 2013. – 221 с.
10. Куркутов Е.О. Синтез новых селеноорганических соединений на основе пирокатехина и селена. Международный научно-исследовательский журнал // Химические науки. – 2017. – № 1(55). – P. 104–107.
11. Племенков В.В. Природные органические соединения селена // Butlerov Communications. – 2006. – № 8(2). – С. 1–5.

12. Русецкая Н.Ю., Бородулин В.Б. Биологическая активность селеноорганических соединений при интоксикации солями тяжелых металлов // Биомедицинская химия. – 2015. – № 61(4). – С. 449–461.
13. Медуницын Н.В. Вакцинология; 2-е изд. – М.: Триада-Х, 2004. – 448 с.
14. Головацкая И.Ф., Володина Н.А. Регуляция роста и вторичного метаболизма клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* 28-гомо-брасинолидом и селеном // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Биотехнология. – 2013. – Т. 15, № 3(5). – С. 1591–1595.
15. Licciardi P.V., Unerwood J.R. Plant-derived medicines: A novel class immunological adjuvants // Int. Immunopharmacol. – 2011. – № 11(3). – P. 390–398.
16. Randhawa A.K., Hawn T.R. Toll-like receptors: Their roles in bacterial recognition and respiratory infections // Expert. Rev. Anti Infect. Ther. – 2008. – № 6(4). – P. 479–495.
17. Смолькова Е.А. Влияние бактерий *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* и их антигенов на экспрессию Toll-подобных рецепторов (TLR2, TLR4) клетками врожденного и адаптивного иммунитета: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03, 14.03.09. – Саратов, 2012. – 22 с.
18. Юрьева О.В., Дубровина В.И. Роль сигнальных систем циклических нуклеотидов в регуляции иммуно- и патогенеза // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 2(84). – С. 159–163.
19. Ogunniyi A.D., Paton J.C., Kirby A.C., McCullers J.A., Cook J., Hyodo M. et al. C-di-GMP is an effective immunomodulator and vaccine adjuvant against pneumococcal infection // Vaccine. – 2008. – № 26(36). – P. 4676–4685.
20. Awate S., Babiuk L.A., Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants // Front Immunol. – 2013. – № 4. – P. 114. – DOI: 10.3389/fimmu.2013.00114
21. Afanas'eva G.A., Chesnokova N.P. On pathogenetic significance of activation of lipid peroxidation in the mechanisms of disturbance of blood rheologic properties in experimental intoxication induced by fraction FII of vaccinal EV strain of *Y. pestis* // Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. – 2009. – № 2. – P. 14–18.

22. Русецкая Н.Ю., Бородулин В.Б. Биологическая активность селенорганических соединений при интоксикации солями тяжелых металлов // Биомедицинская химия. – 2015. – № 61(4). – С. 449–461. – DOI: 10.18097/PBMC20156104449

23. Юрьева О.В., Дубровина В.И., Потанов В.А., Мусалов М.В., Старовойтова Т.П., Иванова Т.А., и др. Влияние синтетического селенорганического препарата на степень патоморфологических изменений органов белых мышей, иммунизированных туляреминой и бруцеллезной вакцинами // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – № 168(7). – С. 76–79.

24. Avery J.C., Hoffmann P.R. Selenium, selenoproteins, and immunity // Nutrients. – 2018. – № 10(9). – P. 1203. – DOI: 10.3390/nut10091203

25. Hamid M., Abdulrahim Y., Dandan L., Gang Q., Khan A., Kehe H. The hepatoprotective effect of selenium-enriched yeast and gum Arabic combination on carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats // J. Food Sci. – 2018. – № 83(2). – P. 525–534. – DOI: 10.1111/1750-3841.14030

26. Mahmoodpoor A., Hamishehkar H., Shadvar K., Ostadi Z., Sanaie S., Saghaleini S.H. et al. The effect of intravenous selenium on oxidative stress in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome. *Immunol Invest.* – 2019. – № 48(2). – P. 147–159. – DOI: 10.1080/08820139.2018.1496098

27. Zhexi L., Jianwei H., Yijuan N., Qazi I.H., Yutao C., Linli W., et al. Selenium treatment enhanced clearance of salmonella in chicken macrophages (HD11) // Antioxidants (Basel, Switzerland). – 2019. – № 8(11). – P. 532. – DOI: 10.3390/antiox8110532

28. Janbakhsh A., Mansouri F., Vaziri S., Sayad B., Afsharian M., et al. The effect of selenium on immunogenicity of influenza vaccine in the elderly: A case-control double-blinded clinical trial // J. Kermanshah Univ. Med. Sci. – 2016. – № 20(1). – P. e69746. – DOI: 10.22110/jkums.v20i1.3122

29. Mahdavi M., Mavandadnejad F., Yazdi M.H., Faghfuri E., Hashemi H., Homayouni-Oreh S., et al. Oral administration of synthetic selenium nanoparticles induced robust Th1 cytokine pattern after HBs antigen vaccination in mouse model // J. Infect. Public Health. – 2017. – № 10(1). – P. 102–109. – DOI: 10.1016/j.jiph.2016.02.006

30. Hawkes W.C., Kelley D.S., Taylor P.C. The effects of dietary selenium on the immune system in healthy men // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2001. – № 81(3). – P. 189–213. – DOI: 10.1385/BTER:81:3:189

31. Yazdi M.H., Varastehmoradi B., Faghfuri E., Mavandadnejad F., Mahdavi M., Shahverdi A.R. Adjuvant effect of biogenic selenium nanoparticles improves the immune responses and survival of mice receiving 4T1 cell antigens as vaccine in breast cancer murine model // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2015. – № 5(12). – P. 10165–10172. – DOI: 10.1166/jnn.2015.11692

32. Yong W., Xuemei C., Lijia Y., Maqbool B., Wei X., Shanshan H., et al. A solution with ginseng saponins and selenium as vaccine diluent to increase Th1/Th2 immune responses in mice // *J. Immunol. Res.* – 2020. – ID 2714257. – DOI: 10.1155/2020/2714257

33. Ma X., Bi S., Wang Y., Chi X., Hu S. Combined adjuvant effect of ginseng stem-leaf saponins and selenium on immune responses to a live bivalent vaccine of Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus in chickens // *Poult. Sci.* – 2019. – № 98(9). – P. 3548–3556. – DOI: 10.3382/ps/pez207

34. Gabalov K.P., Rumina M.V., Tarasenko T.N., et al. The adjuvant effect of selenium nanoparticles, Triton X-114 detergent micelles, and lecithin liposomes for *Escherichia coli* antigens // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2017. – № 53. – P. 587–593. – DOI: 10.1134/S0003683817050040

35. Zhang Z., Xuejiao G., Yongguo C., Haichao J., Tiancheng W., Xiaojing S., et al. Selenium deficiency facilitates inflammation through the regulation of TLR4 and TLR4-related signaling pathways in the mice uterus // *Inflammation.* – 2015. – № 38(3). – P. 1347–1356. – doi: 10.1007/s10753-014-0106-9

36. Hugo V., Serrao B., Scortecchi J.F. Why selenocysteine is unique? // *Front. Mol. Biosci.* – 2020. – № 7(2). – P. 1–3. – DOI: 10.3389/fmolb.2020.00002

37. Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehtab O., Guigo R., et al. Characterization of mammalian selenoproteomes // *Science.* – 2003. – № 300. – P. 1439–1443. – DOI: 10.1126/science.1083516

38. Xin G.L., Wen-Hsing C., McClung J.P. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1 // *Annu. Rev. Nutr.* – 2007. – № 27. – P. 41–61. – DOI: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093716

39. *Разыграев А.В., Мамросова М.О., Тумович И.А.* Роль глутатионпероксидаз в ткани эндометрия: факты, гипотезы, перспективы изучения // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – № 66(2). – P. 104–111. – DOI: 10.17816/JOWD662104-111

40. *Carlson B.A., Yoo M.H., Shrimali R.K., Irons R., Gladyshev V.N., Hatfield D.L., et al.* Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function // Proc. Nutr. Soc. – 2010. – № 69(3). – P. 300–310. – DOI: 10.1017/S002966511000176X

41. *Crosley L.K., Méplan C., Nicol F., Rundlöf A.K., Arnér E.S., Hesketh J.E., Arthur J.R.* Differential regulation of expression of cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in rat liver and kidney // Arch. Biochem. Biophys. – 2007. – № 459(2). – P. 178–188. – DOI: 10.1016/j.abb.2006.12.029

42. *Лямина С.В., Малышев И.Ю.* Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10(5). – P. 930–935.

43. *Артыкбаева Г.М.* Роль дейодиназ 1-го и 2-го типа в метаболизме тиреоидных гормонов // Проблемы эндокринологии. – 2016. – № 2. – P. 46–52. – DOI: 10.14341/probl201662246-52

44. *Lee B.C., Péterfi Z., Hoffmann F.W., Moore R.E., Kaya A., Avanesov A., et al.* MsrB1 and MICALs regulate actin assembly and macrophage function via reversible stereoselective methionine oxidation // Mol. Cell. – 2013. – № 51(3). – P. 397–404. – DOI: 10.1016/j.molcel.2013.06.019

45. *Xiaoxiang Z., Bingyu R., Heng W., Ruikun H., Jun Z., Hongmei L., et al.* Hepatic proteomic analysis of selenoprotein F knockout mice by iTRAQ: An implication for the roles of selenoprotein F in metabolism and diseases // J. Proteomics. 2020. – № 215. – P. 103653. – doi: 10.1016/j.jpro.2020.103653

46. *Yim S.H., Everley R.A., Schildberg F.A., Lee S.G., Orsi A., Barbati Z.R., et al.* Role of selen as a gatekeeper of secreted disulfide-rich glycoproteins // Cell. Rep. – 2018. – № 23(5). – P. 1387–1398. – doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.009

47. *Bertz M., Kühn K., Koeberle S.C., Müller M.F., Hoelzer D., Thies K., et al.* Selenoprotein H controls cell cycle progression and proliferation of human colorectal cancer cells // Free Radic. Biol. Med. – 2018. – № 127. – P. 98–107. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.010

48. Horibata Y., Elpeleg O., Eran A., Hirabayashi Y., Savitzki D., Tal G., et al. EPT1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in humans // *J. Lipid Res.* – 2018. – № 59(6). – P. 1015–1026. – DOI: 10.1194/jlr.P081620

49. Marciel M.P., Hoffmann P.R. Molecular mechanisms by which selenoprotein K regulates immunity and cancer // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2019. – № 192(1). – P. 60–68. – DOI: 10.1007/s12011-019-01774-8

50. Hao J., Qian Q.S., Li Y.G., Qian F.Z., Dong X., et al. Selenoprotein M stimulates the proliferative and metastatic capacities of renal cell carcinoma through activating the PI3K/AKT/mTOR pathway // *Cancer Med.* – 2019. – № 8(10)ю – P. 4836–4844. – DOI: 10.1002/cam4.2403

51. Ziyade F., Shorafa E., Dastsooz H., Habibzadeh P., Nemati H., Saeed A., et al. A novel mutation in SEPN1 causing rigid spine muscular dystrophy 1: A case report // *BMC Medical Genetics.* – 2019. – № 20(1). – P. 13. – DOI: 10.1186/s12881-018-0743-1

52. Han S.J., Lee B.C., Yim S.H., Gladyshev V.N., Lee S.R. Characterization of mammalian selenoprotein O: A redox-active mitochondrial protein // *PLoS One.* – 2014. – № 9(4). – P. e95518. – DOI: 10.1371/journal.pone.0095518

53. Shanshan Y., Jianling D. Selenoprotein S: A therapeutic target for diabetes and macroangiopathy? // *Cardiovasc. Diabetol.* – 2017. – DOI: 10.1186/s12933-017-0585-8

54. Pitts M.W., Hoffmann P.R. Endoplasmic reticulum-resident selenoproteins as regulators of calcium signaling and homeostasis // *Cell Calcium.* – 2018. – № 70. – P. 76–86. – DOI: 10.1016/j.ceca.2017.05.001

55. Barbosa N.V., Nogueira C.W., Nogara P.A., de Bem A.F., Aschner M., Rocha J.B.T. Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents // *Metallomics.* – 2017. – № 9(12). – P. 1703–1734. – DOI: 10.1039/c7mt00083a

56. Zhenming J., Xiaoyu D., Yechun X., Yongqiang D., Meiqin L., Yao Z., et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors // *Nature.* – 2020. – № 582. – P. 289–293. – DOI: 10.1038/s41586-020-2223-y

57. *Zmudzinski M., Rut L.W., Olech K., Granda J., Giurg M., Grabowska M.B., et al.* Ebselen derivatives are very potent dual inhibitors of SARS-CoV-2 proteases – PLpro and Mpro in *in vitro* studies. – 2020. – DOI: 10.1101/2020.08.30.273979

58. *Полубояринов П.А., Елистратов Д.Г., Швец В.И.* Метаболизм и механизм токсичности селенсодержащих препаратов, используемых для коррекции дефицита микроэлемента селена // Тонкие химические технологии. – 2019. – № 14(1). – С. 5–24. – DOI: 10.32362/2410-6593-2019-14-1-5-24

59. *Potapov V.A., Musalov M.V., Musalova M.V., Amosova S.V.* Recent advances in organochalcogen synthesis based on reactions of chalcogen halides with alkynes and alkenes // *Curr. Organ. Chem.* – 2016. – № 20. – P. 136–145.

60. *Мусалов М.В., Потапов В.А., Мусалова М.В., Амосова С.В.* Региоселективный синтез бис[(2,3-ди-гидро-1-бензофуран-2-ил) метил]селенида // Журнал органической химии. – 2014. – № 50(11). – С. 1712–1713.

61. *Юрьева О.В., Дубровина В.И.* Роль сигнальных систем циклических нуклеотидов в регуляции иммуно- и патогенеза // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 84(2). – С. 159–163.

62. *Юрьева О.В., Дубровина В.И., Потапов В.А., Мусалов М.В., Старовойтова Т.П., Иванова Т.А. и др.* Результаты исследования иммунотропных свойств экспериментального синтетического селенорганического соединения // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – № 169(1). – С. 45–48.

63. *Кобец Т.В., Некрасов В.Н., Мотрич А.К.* Роль лейкоцитарных индексов в оценке адаптационно-компенсаторных возможностей чукотских детей, больных рецидивирующим бронхитом, на этапе санаторно-курортного лечения // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2003. – № 1. – С. 47–48.

64. *Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П.* О патогенетической значимости активации процессов липопероксидации в механизмах нарушения реологических свойств крови при экспериментальной чумной интоксикации, индуцируемой фракцией FII вакцинного штамма EV Y. *Pestis* // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2009. – № 2. – С. 14–18.

65. Кузьмина Л.П., Измерова Н.И., Бурмистрова Т.Б., Дружинин В.Н., Дудева Л.А., Иванова Л.А. и др. Патоморфоз современных форм профессиональных заболеваний // Медицина труда и промышленная экология. – 2008. – № 6. – С. 18–24.

66. *Fernández-Lodeiro J., Pinatto-Botelho M.F., Soares-Paulino A.A., Gonçalves A.C., Sousa B.A., Princival C. et al.* Synthesis and biological properties of selenium- and tellurium-containing dyes // *Dyes Pigments*. – 2014. – № 110. – P. 28–48.

67. *Huang Z., Rose A.H., Hoffmann P.R.* The role of selenium in inflammation and immunity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities // *Antioxidants Redox Signal*. – 2012. – № 16(7). – P. 705–743.

68. *Potapov V.A., Musalov M.V., Musalova M.V., Amosova S.V.* Recent advances in organochalcogen synthesis based on reactions of chalcogen halides with alkynes and alkenes // *Curr. Organic Chem.* – 2016. – № 20. – P. 136–145.

69. *Киселев В.В., Каширина Н.К.* Структура надпочечников белых крыс после введения ксеногенной спинномозговой жидкости до наступления полового созревания // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – № 15(2). – С. 101–104.

70. *Сысоева Л.А., Овсянникова Н.Н., Ляхова О.Л.* Лейкоцитарная формула как показатель адаптационного статуса сельских и городских жителей // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2017. – № 17(2). – С. 201–207.

71. Патоморфогенез сибирской язвы / под ред. П.Н. Бургасова. – М., 2002.

72. *Исупов И.В., Бугоркова С.А., Кутырев В.В.* Патоморфологические аспекты доклинических испытаний различных вакцин против чумы, сибирской язвы и холеры. – Саратов, 2004.

73. *Коржевский Д.Э., Гиляров А.В.* Основы гистологической техники. – СПб.: Специальная литература; 2010. – 147 с.

74. *Меркулов Г.А.* Курс патогистологической техники. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.

75. *Демидова Т.Н., Алешо Н.А., Михайлова Т.В., Семихин А.С., Алешо Н.А., Михайлова Т.В. и др.* Туляремия: учебное пособие. – М., 2020. – 104 с.

33. *Постовалова Е.А., Макарова О.В., Косырева А.М., Михайлова Л.П.* Морфология тимуса и особенности его клеточного состава

при экспериментальном остром и хроническом язвенном колите // Архив патологии. – 2019. – № 81(5). – С. 53–63. – DOI: 10.17116/patol20198105153

76. Беловешкин А.Г., Стельмах И.А., Студеникина Т.М. Субпопуляции нейроэндокринных клеток мозгового вещества тимуса человека // Молодой ученый. – 2013. – № 4(51). – Р. 627–631.

77. Парамзин Ф.Н. Морфологическая характеристика телец Гассала в случаях уменьшения массы тимуса // Новые задачи современной медицины: Материалы III Международной научной конференции (Санкт-Петербург, 2014). – СПб.: Сатис, 2014. – С. 54–55.

78. Доровских В.А, Баталова Т.А, Сергиевич А.А, Уразова Г.Е. Глюкокортикоиды – от теории к практике: учебное пособие. – Благовещенск, 2006. – 77 с.

Научное издание

Дубровина Валентина Ивановна
Корытов Константин Михайлович
Пятидесятникова Анна Борисовна и др.

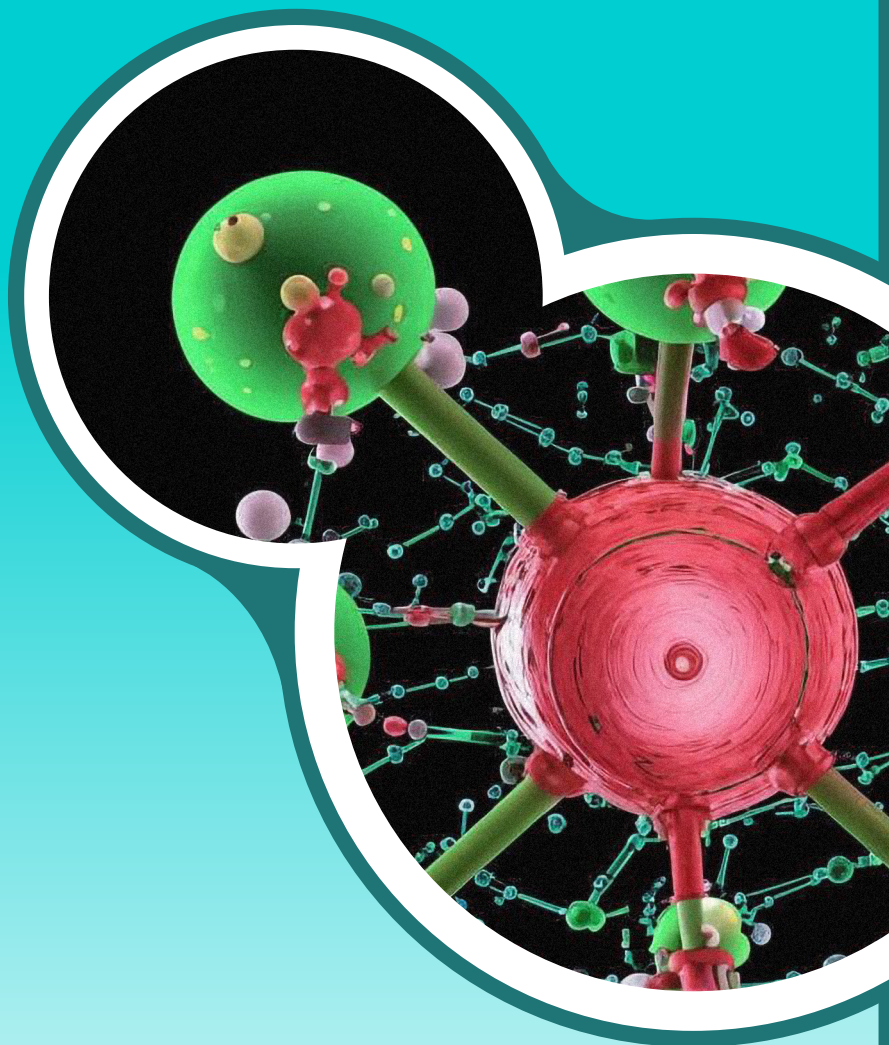
**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО
СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ
ПОВЫШЕНИЯ ИММУНОГЕННОЙ И ПРОТЕКТИВНОЙ
АКТИВНОСТИ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

Под редакцией
профессора
С.В. Балахонова

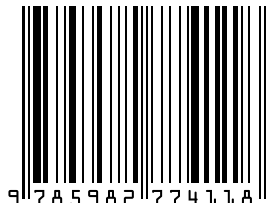
Редактор, корректор *Черных О.Л.*
Оригинал-макет *Арсентьев Л.И.*
Иллюстрации, обложка *Фалеев К.А.*

Сдано в набор 04.12.24. Подписано в печать 29.12.24. Формат 60x84 ¹/₁₆.
Бумага офсетная. Гарнитура TimesNewRoman.
Усл.-печ. л. 6,3. Уч.-изд. л. 5,2. Тираж 300 экз. Заказ № 054-24.

Отпечатано в ФГБНУ ИНЦХТ
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. (395-2) 29-03-37.
E-mail: arleon58@gmail.com



ISBN 978-5-98277-411-8



9 785982 774118