

На правах рукописи

Зырина

Екатерина Витальевна

**АНАЛИЗ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА
СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS***

специальности: 03.02.03 – микробиология

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Оболенск – 2015

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Научный руководитель:

Бикетов Сергей Федорович, кандидат биологических наук

Научный консультант:

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Алешкин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов.

Нафеев Александр Анатольевич, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ульяновский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, профессор кафедры инфекционных и кожно-венерических болезней медицинского факультета.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Защита диссертации состоится **«25» сентября 2015 года в 11 часов** на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский район, пос. Оболенск.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, www.obolensk.org

Автореферат разослан « » _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Облигатные кровососущие эктопаразиты – клещи - обитают практически во всех уголках земного шара. Многие из них являются универсальными и высокоэффективными переносчиками возбудителей природно-очаговых заболеваний. В Северном полушарии ведущее положение среди трансмиссивных заболеваний занимает иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), также известный под названием болезнь Лайма или Лайм-боррелиоз. Возбудителями ИКБ являются патогенные виды боррелий, относящиеся к группе *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Главными переносчиками этиологических агентов болезни Лайма являются иксодовые клещи: *Ixodes scapularis* и *Ixodes pacificus* – в Новом свете и *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus* – в Европе и Азии.

В последние годы достигнуты значительные успехи в понимании биологии патогенных боррелий, являющихся возбудителями ИКБ. Наряду с этим появляется все больше данных о том, что в патогенезе заболевания важную роль играют продукты жизнедеятельности самих векторов-переносчиков. Слюна иксодовых клещей является многокомпонентной системой, которая обеспечивает возможность полноценного питания, продолжающегося в зависимости от вида клеща и стадии его развития от нескольких дней до нескольких недель. В течение этого времени биологически-активные компоненты слюны постоянно регулируют взаимодействие клеща с организмом хозяина (Brossard, 2004; Gillespie et al., 2000; Schoeler et al., 2001; Wikel, 1999).

Показано, что слюна иксодовых клещей ингибирует неспецифический (врожденный) иммунный ответ, в частности альтернативный путь комплемента, фагоцитоз и выработку нейтрофилами и макрофагами супероксида и оксида азота (Novius et al., 2008; Nunn et al., 2005; Roversi et al., 2007; Schroeder et al., 2007; Tyson et al., 2007; Valenzuela et al., 2000). Также установлено воздействие слюны *I. ricinus* и *I. scapularis* на адаптивный иммунитет, что отражается в изменении концентраций ряда цитокинов (снижение IL-8, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-1 α , TNF- α и увеличение IL-10, TGF- β , IL-4), ингибировании пролиферации Т-клеток и связывании иммуноглобулинов (Ferreira et al., 1999; Gillespie et al., 2001; Hajnicka et al., 2005; Mejri et al., 2001; Schoeler et al., 1999; Wikel, 1996).

Подобная модуляция иммунных реакций хозяина в месте укуса клеща облегчает проникновение, выживание и диссеминацию патогенных боррелий в организме позвоночных (Francischetti et al., 2003; Hajnicka et al., 2005; Novius et al., 2008; Schoeler et al., 2001). Следовательно, исследования состава, спектра активности слюны клещей и механизмов ее воздействия на иммунный ответ хозяина актуальны.

Таким образом, представляется чрезвычайно актуальным изучение свойств компонентов слюнных желез клещей *I. persulcatus* как в фундаментальном плане (для дальнейшего понимания иммунопатогенеза трансмиссивных очаговых инфекций, переносчиками возбудителей которых являются клещи данного вида), так и в прикладном аспекте (для разработки новых типов вакцин и диагностических тест систем).

Используемые сокращения: Аг – антиген, антигены, Ат – антитело, ИКБ – иксодовые клещевые боррелиозы, ИКК – иммунокомпетентные клетки, ИС – индекс стимуляции, ИФА – иммуноферментный анализ, КММ – костно-мозговые макрофаги, МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид, МКАТ – моноклональные антитела, Тх (Тх-1 и Тх-2) – Т-хелперы (субпопуляции Т-хелперных лимфоцитов первого типа и второго типа), ЭСЖ (ЭСЖГ/ЭСЖН) – экстракт слюнных желез клещей (голодных/частично-насыщенных), ВВК32 - фибронектин связывающий Аг боррелий, CD – лейкоцитарный поверхностный антиген (от Cluster Differentiation), DbpA – декорин-связывающий протеин боррелий, ДДС - додецилсульфат натрия, ПААГ – полиакриламидный гель, TLR - Toll-подобный рецептор (от англ. «Toll-Like Receptor»)

Степень разработанности темы исследования

К настоящему времени идентифицировано значительное количество иммуногенных молекул из слюны иксодовых клещей, некоторые из них обладают свойствами протективных антигенов, которые могут препятствовать процессу насыщения клеща и снижать вероятность заражения патогенами (Brossard et al., 2004; Novius et al., 2008; Valenzuela et al., 2002). К числу таких кандидатных белков, которые могут быть использованы при создании антиклещевых вакцин, относятся, например, серпины (Prevot et al., 2007), лонгистатины (Anisuzzaman et al., 2011; Anisuzzaman et al., 2012), липокалина (Konnai et al., 2011) и суболезины (Carreóna et al., 2012). Особое внимание исследователей привлекают различные белки слюны клещей (Salps), поскольку было установлено их значительное влияние на иммунный ответ хозяина и патогенез ИКБ. К числу таких белков относится Salp15, для которого показана способность связываться с поверхностными структурами патогенных боррелий и супрессировать иммунитет хозяина (Anguita et al., 2002; Novius et al., 2008; Ramamoorthi et al., 2005). Кроме этого, установлено увеличение экспрессии *salp15* генов у клещей *I. persulcatus* на начальных этапах кормления (Штанников и др., 2009; Штанников и др., 2010; Hojgaard et al., 2009), что позволяет рассматривать белок Salp15 в качестве перспективного кандидата для создания вакцин против ИКБ (Novius et al., 2008; Ramamoorthi et al., 2005; Titus et al., 2006).

Следует отметить, что основное внимание исследователи уделяют так называемым внешним Аг – компонентам слюнных желез, поскольку внутренние клещевые Аг (компоненты клеток средней кишки) непосредственно не контактируют с иммунной системой хозяина. Они не индуцируют иммунный ответ при прикреплении и в начале питания клеща (Agbede et al., 1986; Willadsen et al., 1988).

К настоящему времени все интересные и значимые результаты по иммуномодулирующей активности слюны клещей получены в экспериментах с использованием *I. scapularis*, *I. pacificus* и *I. ricinus*, но не *I. persulcatus*, который доминирует на территории Евразии и ареал его обитания охватывает практически всю территорию РФ.

Таким образом, исходя из данных литературы, исследования по воздействию компонентов слюны клещей *I. persulcatus* на клеточный и гуморальный иммунный ответ мышей линии BALB/c, по развитию у них резистентности к виду клещей *I. persulcatus* и по протективности сформированного иммунитета к заражению боррелиями через укус до настоящего времени не проводились.

Цели и задачи

Цель исследования – оценка иммуномодулирующего действия экстракта слюнных желез *Ixodes persulcatus* на звенья клеточного иммунитета, существенные для защиты от боррелиозной инфекции.

Задачи исследования:

1. Оценить иммуномодулирующее действие экстракта слюнных желез (ЭСЖ) клещей *Ixodes persulcatus* при разных стадиях их насыщения на иммунокомпетентные клетки (ИКК) мышей линии BALB/c *in vitro*.

2. Изучить способность клещей вида *I. persulcatus* вызывать развитие антиклещевого иммунитета у мышей линии BALB/c при повторных кормлениях на них паразитов и оценить уровень формируемой защиты мышей от инфицирования боррелиями через укус клещей.

3. Оценить уровень иммунного ответа мышей линии BALB/c при иммунизации рекомбинантным белком слюны клещей *I. persulcatus* Salp15 и способность сформированного иммунитета защищать мышей от заражения боррелиями через укус клеща.

4. Определить влияние антигенов боррелий на лимфоциты, выделенные от интактных и инфицированных боррелиями лабораторных мышей линии BALB/c и возможность использования исследуемых антигенов в клеточных тестах для ранней диагностики иксодовых клещевых боррелиозов *in vitro*.

Научная новизна

Впервые установлено иммуномодулирующее действие экстрактов слюнных желез голодных и частично насыщенных клещей вида *I. persulcatus*, которое проявляется в снижении продукции макрофагами мышей цитокинов IL-12, TNF- α и IL-10 и окиси азота (NO); изменении доли активированных лимфоцитов, экспрессирующих CD69, TLR-2, TLR-4 рецепторы; сдвиге направленности иммунного ответа (Тх-1/Тх-2) через изменение количества Т-хелперов, синтезирующих цитокины IFN- γ и IL-4.

Впервые определен уровень индукции гуморального и клеточного ответа на экстракт слюнных желез у мышей линии BALB/c, подвергшихся повторным напускам клещей, и продемонстрированы антигенные свойства слюны клещей *I. persulcatus*.

Впервые установлено, что иммунизация рекомбинантным белком Salp15 *I. persulcatus* мышей линии BALB/c индуцирует у них развитие как клеточного, так и гуморального иммунитета, который приводит к частичной протективной защите животных в модели инфицирования боррелиями через зараженных клещей.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования иммуногенных и протективных свойств рекомбинантного белка Salp15 позволяют рассматривать его как перспективный компонент антиборрелиозной вакцины и обосновывать возможность создания эффективных противоклещевых вакцин. Так же разработана методология оценки формирования антиклещевого иммунитета по критериям, которые основаны на изменениях субпопуляционного состава лимфоцитов и гуморальном ответе на антигены слюны клещей. Результаты данных исследований использованы при выполнении Федеральной целевой программы «Химическая и биологическая безопасность РФ (ГК № 63 «Разработка кандидатных вакцин на основе ДНК и рекомбинантных антигенов против зоонозных и трансмиссивных инфекций») от 22.07.2011 г. и проекта МНТЦ № 3171 «Роль слюны *Ixodes persulcatus* при иммунопатогенезе болезни Лайма» 2005-2008 гг.

Установлены особенности изменения количества Т-лимфоцитов с различной экспрессией ко-стимуляторных рецепторов при специфической активации рекомбинантными антигенами боррелий (DbpA и ВВК32) на начальной стадии развития боррелиоза. Результаты исследований послужили основой для составления методических рекомендаций «Использование клеточных тестов для обнаружения ранней стадии боррелиоза» (Оболенск, 2015, учрежденческий уровень внедрения), которые позволяют рассматривать применение клеточных тестов для ранней *in vitro* диагностики заболевания.

Материалы диссертации использованы в учебной Программе дополнительного профессионального образования «Лабораторная диагностика боррелиозов» при ФБУН ГНЦ ПМБ, утвержденной Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ 26.09.2012 г., протокол № 8, федеральный уровень внедрения.

Методология и методы исследования

Методология настоящей работы соответствовала поставленным целям и задачам. Предметом исследования стало изучение влияния слюны клещей *I. persulcatus* на клеточный и гуморальный иммунный ответ мышей линии BALB/c, существенный для защиты от боррелиозной инфекции. Анализ научной литературы по данной проблеме проводился на основе теоретико-эмпирических и формально-логических методов исследования. Планирование и проведение экспериментов осуществлялось на основе общенаучных и частнонаучных методов.

Объекты и методы исследования

Лабораторные животные.

В экспериментах использовали беспородных и линейных BALB/c мышей в возрасте 10-12 недель, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино» ФИБХ.

Штаммы боррелий.

В работе использовали штаммы возбудителей ИКБ *B. afzelii* Н-13 и *B. garinii* Siu, полученные из рабочей коллекции живых культур сектора «Лайм боррелиоза» ГНЦ ПМБ.

Клещи *I. persulcatus*.

В исследованиях использовали лабораторную колонию клещей *I. persulcatus*, поддерживаемую в НИИ Медицинской Паразитологии и Тропической Медицины им. Е. И. Марциновского, г. Москва.

Культивирование боррелий.

Наработку биомассы боррелий, культивирование спирохет из клещей и зараженных животных проводили методом глубинного культивирования в пластиковых одноразовых пробирках, используя среду BSK-II (Barbour, 1984), с компонентами от производителя SIGMA. Для предотвращения контаминации посторонней микрофлорой при выделении боррелий из клещей и тканей животных в среду BSK II добавляли антибиотики в следующих концентрациях: рифампицин – 50 мкг/мл, амфотерицин В – 2,5 мкг/мл, фосфомицин – 20 мкг/мл, ципрофлоксацин – 0,5 мкг/мл. Культуры инкубировали в стационарных условиях при 37⁰ С в термостате в течение 4 недель. Концентрацию боррелий в культуре определяли при помощи темнопольной микроскопии (микроскоп Olympus BX 41). Наличие бактериального роста регистрировали по изменению цвета среды с розового на желтый.

Культивирование клещей.

Клещей *I. persulcatus* культивировали в соответствии с МУК 4.2.1480-03 «Методы лабораторного культивирования трех видов иксодовых клещей группы *ricinus/persulcatus*», утвержденными Главным государственным санитарным врачом РФ в 2003 г.

Инфицированных клещей получали при напуске личинок на зараженных беспородных мышей. Сформировавшихся после линьки инфицированных нимф использовали для заражения сенсibilизированных мышей. Инфицированность нимф, подтвержденная с помощью ПЦР, 70-80 % для *B. garinii* Siu и 85-90 % для *B. afzelii* Н13.

Получение ЭСЖ.

Слюнные железы голодных и частично-напитавшихся самок *I. persulcatus* извлекали под биноклем с помощью препаровальных игл в охлажденный стерильный фосфатно-солевой буфер, затем гомогенизировали на ультразвуковом дезинтеграторе («VirSonic 100») 10 циклами озвучивания (30 с - импульсы, 30 с - перерыв) на ледяной бане, центрифугировали (10000 об/мин, 10 мин, 4⁰ С) и стерилизовали через фильтр с диаметром пор 0,20 мкм. Экстракты хранили в аликвотах при – 80⁰С.

Иммунизация мышей рекомбинантным белком Salp15.

Для иммунизации мышей рекомбинантным белком Salp15 его вводили трижды: п/к в дозе 100 мкг/мышь с полным адьювантом Фрейнда, п/к в дозе 100 мкг/мышь с неполным адьювантом Фрейнда и затем внутривентриально (бустер) 10 мкг/мышь. Интервал между иммунизациями составлял 3 недели.

Сенсibilизация мышей компонентами слюны клещей.

Животных сенсibilизировали путем повторных кормлений на них незараженных клещей *I. persulcatus*. На каждую особь напускали по 30 нимф, которые питались до полного насыщения. Интервал между напусками составлял 3 недели.

Модель боррелиозной инфекции на мышах.

Для заражения мышам подкожно вводили в область спины чистую культуру российских изолятов боррелий *B. afzelii* Н13 в дозе 10⁶ боррелий на мышь в 50 мкл среды BSK-II. Контрольным мышам вводили аналогичный объем среды BSK-II.

Определение обсемененности биоматериала с помощью ПЦР-РВ.

Подтверждение инфицированности мышей проводили на 7, 14, 30, 48 сутки после их заражения. Для этого выделяли суммарную ДНК из мочевого пузыря, ушной раковины, бедренно-большеберцового сустава и сердца инфицированных мышей.

Инфицированность нимф, которых использовали для заражения мышей боррелиями, определяли путем выделения суммарной ДНК из гомогената нимф.

В качестве ДНК-мишени использовали ген флагеллина *B. bugdorferi*. Для синтеза фрагмента гена *flab* использовали праймеры: прямой (FL-571F) – 5'-gcagctaattgtgcaaatcttttc-3', обратный (FL-677R) - 5'-gcagtgctggctgttga-3' и TaqMan-зонд (FL-611P) - 5'- FAM - aaactgctcaggctgcaccgggttc-RTQ-1-3'. Амплификацию проводили на приборе MiniOpticon (BioRad), используя «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой и ингибирующими активностью фермента антителами в присутствии референс-препарата красителя ROX» (Синтол). Для получения стандартной кривой использовали ДНК, выделенную из суспензий боррелий, с известными концентрациями клеток, определенными микроскопически. Анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Opticon Monitor.

Получение антигенов.

Рекомбинантные белки Salp15, ВВК32 и DbpA были наработаны с использованием штаммов–продуцентов *E. coli* и затем очищены с помощью аффинной хроматографии на сорбенте Iminodiacetic acid Sepharose (Sigma-Aldrich, США).

Иммунодоминантный фрагмент антигена VlsE (26-мерный синтетический пептид С₆) был получен методом твердофазного синтеза пептидов в НИИ высокомолекулярных соединений РАН (С-Петербург). Структура пептида была подтверждена методами масс-спектрометрии и аминокислотного анализа.

Суммарный клеточный антиген боррелий был получен из биомассы боррелий 10 циклами озвучивания на ледяной бане на аппарате «VirSonic 100», с последующим центрифугированием 20 мин при 15 000 об/мин, 4°С.

Чистоту и молекулярную массу белков оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970), а примеси ЛПС в исследуемых препаратах выявляли при помощи окрашивания серебром (Fomsgaard et al., 1990).

Для электрофоретического анализа белкового состава препарата слюнных желез использовали Bio-Rad Protean II xi cell (изофокусирование в 16-см стеклянном капилляре с градиентами рН 3-10, двумерный электрофорез с градиентами 5-20%).

Определение концентрации белка.

Концентрацию белка в препаратах определяли набором Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (SIGMA, США) на планшетном анализаторе VICTOR™X3 (PerkinElmer, Финляндия), с использованием программы WorkOut 2,5, согласно инструкции производителя.

Культивирование эукариотических клеток.

В качестве источника лимфоцитов использовали селезенки мышей. Клеточные суспензии полученные из селезенок культивировали в полной культуральной среде RPMI 1640 с исследуемыми препаратами при 37°С, во влажной атмосфере 5 % CO₂ в течение 24 – 72 ч в зависимости от условий эксперимента.

Для получения монослоя костномозговых макрофагов (КММ) из бедренных костей мыши извлекали клетки путем промывания средой DMEM. Клеточную взвесь отмывали, доводили концентрацию до 2x10⁶ клеток/мл, переносили в 96-луночный планшет для культур тканей (по 100 мкл/лунку) и инкубировали в среде для КММ при 37°С, в 5 % CO₂ в течении 6-8 дней для формирования монослоя макрофагов.

Определение продукции КММ цитокинов и NO.

Концентрацию цитокинов IL-12, TNF-α, IL-10 и NO в супернатантах культур КММ определили через 24 ч после стимуляции суммарным клеточным антигеном *B. afzelii* Н-13 (10 мкг/мл) совместно с ЭСЖ *I. persulcatus* (20 мкг/мл), с помощью наборов IL-12 Mouse Elisa kit, TNF-α Mouse Elisa kit, IL-10 Mouse Elisa kit и «Griess Reagent System» (производства eBioscience и Promega Corporation, США) согласно инструкциям.

Определение титра специфических IgG к ЭСЖН и рекомбинантному белку Salp15 в сыворотках крови мышей проводили с помощью твердофазного ИФА. Планшеты (High binding «Greiner bio-one», Германия) сенсibiliзировали ЭСЖН или белком в течение ночи, при 4°С. Титр специфических антител выявляли с использованием пероксидазного

конъюгата антимышиных антител (Sigma, США) и тетраметиленбензидина (ХимБиоТест, Россия). Оптическую плотность регистрировали в лунках планшета при длине волны 450 нм на планшетном анализаторе VICTOR™X3 (PerkinElmer, Финляндия).

Определение цитотоксического эффекта.

Определение цитотоксического эффекта на ИКК мышей *in vitro* проводили при помощи МТТ-теста на 24, 48, 72 ч инкубирования спленоцитов с исследуемыми препаратами (ЭСЖН, ЭСЖГ, Salp15). Оптическую плотность в лунках измеряли при длине волны 595 нм на планшетном анализаторе VICTOR™X3 (PerkinElmer, Финляндия) с использованием программного обеспечения WorkOut 2,5, согласно инструкции производителя.

Проточная цитометрия.

Цитометрический анализ образцов проводили при помощи цитометра FACSCalibur (Becton-Dickinson, США) и встроенной программы «CellQuestPro». В качестве критерия активации использовали маркер ранней активации лимфоцитов CD69, а так же рецепторы TLR-2, TLR-4, и внутриклеточные цитокины Т-клеток: TNF- α , IFN- γ , IL-4.

Клеточную суспензию спленоцитов (2×10^6 клеток/мл, 200 мкл/лунка 96-луночных планшетов («Costar»)) культивировали в присутствии Аг/активатора или без стимуляции в течение 24 и 48 часов. Суспензию переносили в цитометрические пробирки (FALCON BD, 12x75 мм) и перед анализом окрашивали соответствующими флуоресцентными МКАТ (BD Pharmingen™, CALTAG™ Invitrogen, Nycult Biotech, BD Biosciences) или флуорохромным красителем 7 AAD (BD Biosciences) (для определения жизнеспособности спленоцитов) согласно инструкциям производителей.

Статистические методы.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel. Различия между средними величинами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при значении $P < 0,05$.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Экстракт слюнных желез клещей (ЭСЖ) *I. persulcatus* оказывает иммуномодулирующее действие на врожденный и адаптивный иммунитет мышей, что выражается:

- а) в снижении продукции цитокинов IL-12, TNF- α , IL-10 и NO фагоцитами;
- б) в изменении доли активированных митогеном Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих CD69, TLR-2, TLR-4 рецепторы;
- в) в сдвиге направленности иммунного ответа от Тх-1 к Тх-2 (через изменение количества Т-хелперов, синтезирующих цитокины IFN- γ и IL-4).

2. Повторное кормление незараженных клещей *I. persulcatus* на мышах формирует противоклещевой иммунитет, который можно оценить *in vitro* по изменению индекса стимуляции (митогеном/Аг) субпопуляций CD3+CD69+ и CD19+TLR-2+ и по увеличению количества специфических IgG к ЭСЖ напитавшихся клещей. Противоклещевой иммунитет обеспечивает частичную (80 %) устойчивость мышей к заражению возбудителями боррелиоза через укус клеща.

3. Рекомбинантный белок Salp15 обладает иммуногенностью и протективностью, что выражается:

- а) в индукции клеточного и гуморального иммунитета у иммунизированных этим белком мышей;
- б) в частичной защите мышей в модели боррелиоза при инфицировании через зараженных клещей.

4. Рекомбинантные антигены DbpA и BVK32 *Borrelia afzelii* H13 вызывают специфическую активацию лимфоцитов мышей зараженных боррелиями (в системе *in vitro*), что предлагается использовать для ранней *in vitro* диагностики боррелиоза.

Личный вклад соискателя

Все эксперименты *in vitro* по получению и культивированию лимфоцитов, цитометрические исследования, определение уровня специфических антител, спектрофотометрические измерения, статистическая обработка, анализ и интерпретация результатов были проведены автором лично. Автор принимал участие в планировании и проведении экспериментов совместно с сотрудниками НИИ МПиТМ им. Е.И. Марциновского (с.н.с., к.б.н. Васильевой И.С. и лаборантом Гальченко С.С.) по сенсибилизации мышей путем кормления на них клещей, определении критериев формирования антиклещевого иммунитета.

Рекомбинантные белки Salp15 *I. persulcatus*, DbpA и BVK32 *B. afzelii* H13 получены и охарактеризованы совместно с сотрудниками отдела иммунобиохимии н.с. Решетняк Т.В., н.с. Реполовской Т.В., н.с. Мочаловым В.В., с.н.с., к.б.н. Панферцевым Е.А.

Эксперименты по моделированию боррелиозной инфекции на мышах (иммунизация животных, ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с целью определения концентраций ДНК боррелий в тканях инфицированных мышей) проводили совместно с сотрудниками отдела иммунобиохимии с.н.с., к.б.н. Щит И.Ю. и зав.сектором, к.б.н. Штанниковым А.В.

Степень достоверности и апробация работы

Высокая степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается использованием современных методов микробиологии, биотехнологии, иммунобиохимии и обработки информации. Все экспериментальные результаты получены на сертифицированном оборудовании.

В диссертационной работе приведено сравнение авторских данных с данными, опубликованными ранее в мировой научной литературе по исследуемой тематике.

Результаты работы были представлены на восьми российских и международных научных конференциях: научно-практической школе-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболensk, Московская область, 2010 г.); 14-й Пущинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2010 г.); 14-м международном конгрессе по Инфекционным Заболеваниям (Майями, 2010 г.); VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010» (Москва, 2010 г.); 2-й Международной школе по практической проточной цитометрии (Москва, 2011 г.); 16-й Пущинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2012 г.); III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012 г.); Объединенном иммунологическом Форуме-2013 (Нижний Новгород, 2013 г.).

Публикации

Основное содержание диссертационной работы отражено в 12 публикациях, из которых три статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК. восемь публикаций в сборниках, трудах и материалах конференций и одни методические рекомендации.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения и 5 глав, включая обзор литературы, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (содержит 222 цитируемых работ, из них 31 – отечественных, 191 – иностранных авторов).

Объем диссертации составляет 125 страниц машинописного текста. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 6 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

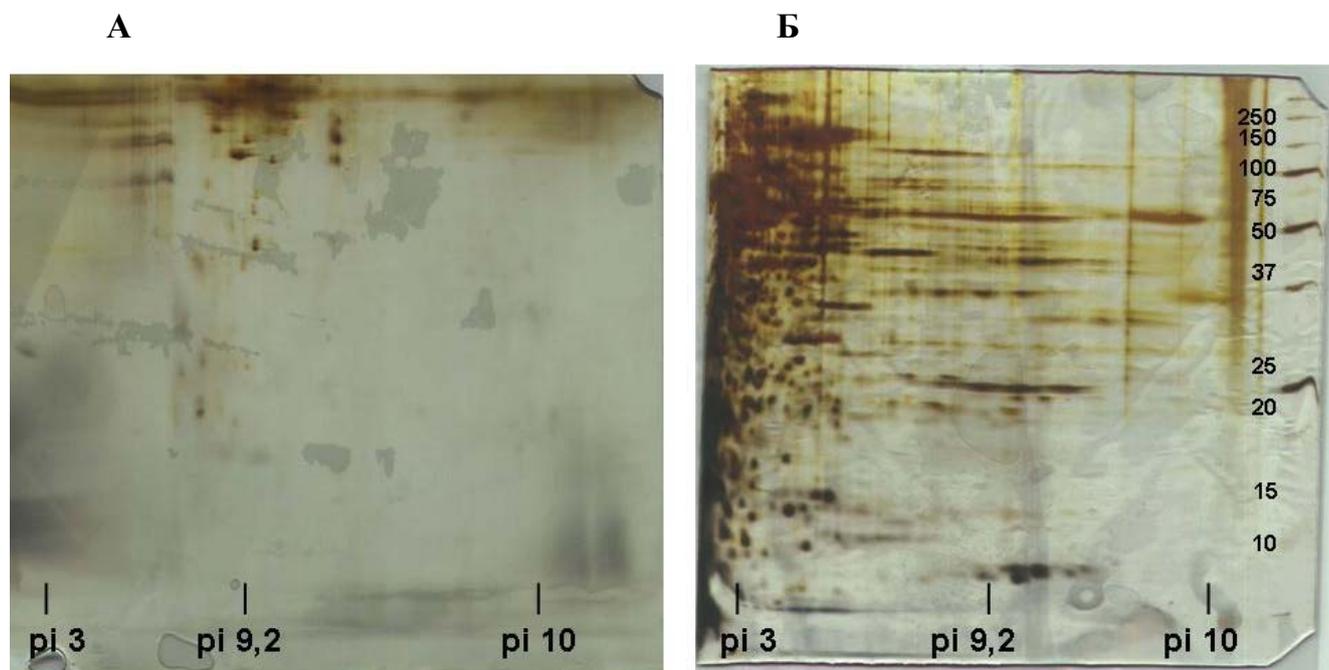
Результаты исследования

Характеристика экстракта слюнных желез

Известно, что слюна иксодовых клещей содержит сотни различных биологически активных веществ. Некоторые такие протеины экспрессируются на разных фазах питания клеща (Francischetti et al., 2009). Изменения белкового спектра слюны способствует его защите от иммунной системы хозяина. Поэтому, для анализа иммуномодулирующего действия слюны от начала питания и в последующей стадии использовали экстракты слюнных желез как от голодных (ЭСЖГ) так и от частично-напитавшихся (ЭСЖН) клещей.

Экстракты слюнных желез клещей после их получения исследовали на количество суммарного белка, содержание которого в ЭСЖГ и ЭСЖН составило 1 мг/мл и 1,5 мг/мл соответственно. Препарат ЭСЖ достаточно сложно стандартизировать, поэтому для того чтобы уйти от возможной вариабельности, мы использовали одну партию экстрактов, которую хранили в аликвотах до использования при -80°C .

Для электрофоретического анализа белкового состава препарата слюнных желез проводили изофокусирование в 16-см стеклянном капилляре с градиентами рН 3-10 и двумерный электрофорез (с градиентами 5-20 %), используя Bio-Rad Protean II xi cell.



pI – изоэлектрическая точка

Рисунок 1 – Двумерный электрофорез экстракта слюнных желез голодных (А) и частично-напитавшихся (Б) клещей

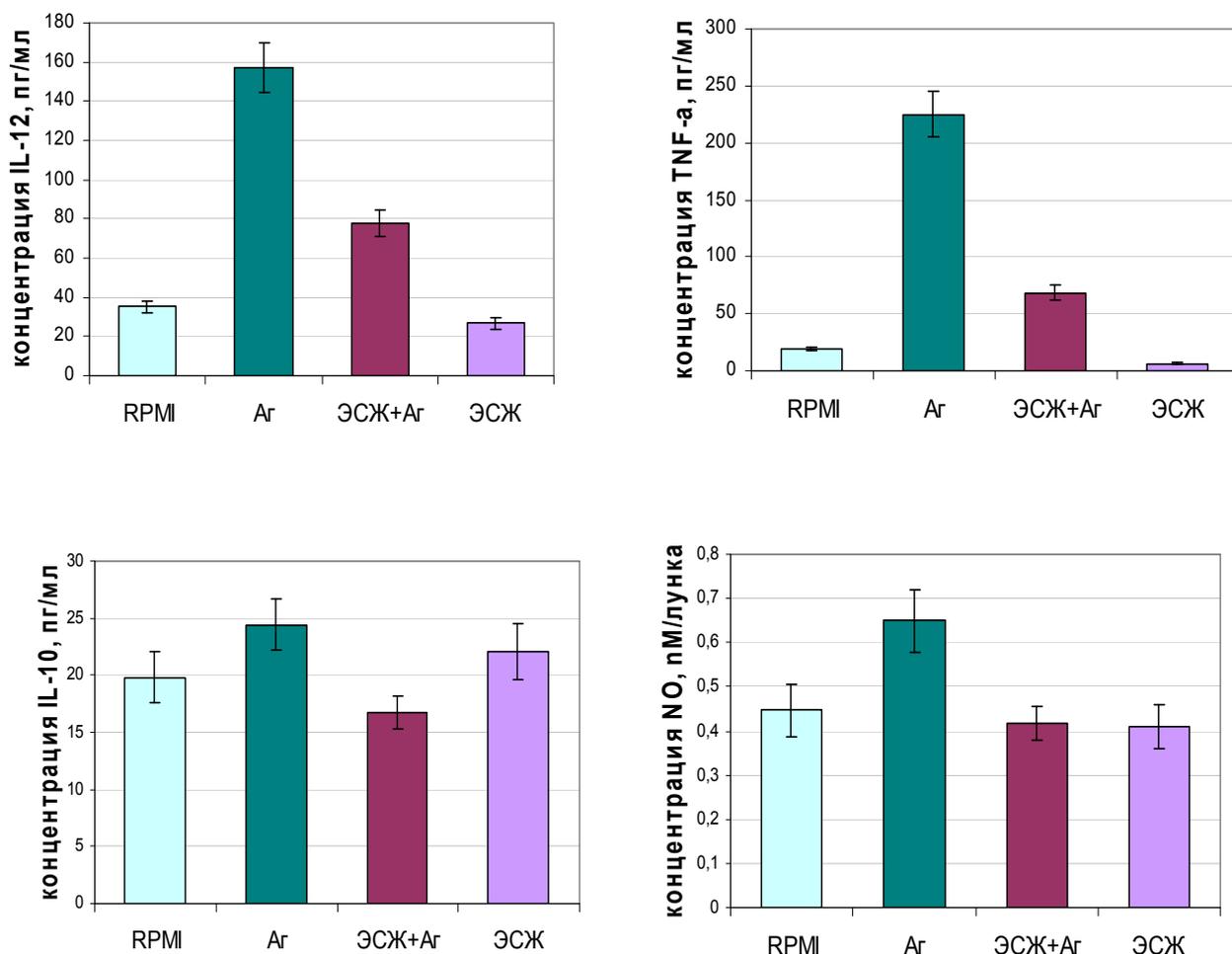
На рисунке 1 представлены электрофореграммы ЭСЖГ и ЭСЖН, на которых видно изменение в белковом профиле экстрактов по мере насыщения клеща. В случае ЭСЖН появляются интенсивно выраженные белковые зоны с различными молекулярными массами.

Анализ иммуномодулирующего действия экстракта слюнных желез иксодовых клещей *I. persulcatus* на иммунокомпетентные клетки мышей линии BALB/c

Первоначально для исключения вклада цитотоксичности в иммуномодулирующие эффекты провели анализ гибели ИКК мышей под действием различных концентраций ЭСЖГ и ЭСЖН *I. persulcatus* с помощью МТТ-теста и цитометрического анализа клеток, окрашенных красителем 7 ААД. Установили, что оба ЭСЖ *I. persulcatus* не оказывали значительного влияния на жизнеспособность ИКК мышей в концентрациях до 50 мкг/мл. Относительное количество погибших клеток в состоянии апоптоза/некроза составило 2,3 %, что сопоставимо с контролем. Следовательно, при оценке иммуносупрессирующего действия ЭСЖ следует исключить его цитотоксический эффект.

Для определения иммуномодулирующего действия экстрактов на макрофаги интактных мышей оценили продукцию цитокинов IL-12, TNF- α , IL-10 и NO на фоне стимуляции этих клеток полным антигеном *B. afzelii* Н-13 (Аг).

Оба экстракта (ЭСЖН и ЭСЖГ) проявили схожие эффекты на макрофаги, но более сильное влияние на продукцию цитокинов регистрировали в присутствии ЭСЖН. Результаты представлены на рисунке 2.



RPMI – клетки не обработанные экстрактом слюнных желез; Аг – клетки не обработанные экстрактом слюнных желез, в присутствии Аг в среде; ЭСЖ+Аг – клетки обработанные экстрактом слюнных желез, в присутствии Аг в среде; ЭСЖ – клетки обработанные экстрактом слюнных желез

Рисунок 2 - Влияние экстракта слюнных желез частично-напитавшихся клещей на функциональное состояние макрофагов мышей в системе *in vitro*

Как видно из рисунка 2, уровень продукции цитокинов и NO увеличивался в присутствии Аг. Если же в культуры фагоцитов предварительно вносили ЭСЖН, то количество IL-12, TNF- α , IL-10 и NO снижалось в 2,01; 3,28; 1,46; 1,59 раз, соответственно. На активность покоящихся фагоцитов ЭСЖН существенного влияния не оказывал, уровень синтеза цитокинов и NO оставался сопоставимым с контролем.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о супрессирующем действии как ЭСЖН, так и ЭСЖГ на процесс антигенной активации макрофагов *in vitro*, что может выразиться *in vivo* в изменении их функциональной активности в месте укуса клеща.

Сравнительную оценку воздействия ЭСЖГ и ЭСЖН *I. persulcatus* на экспрессию рецепторов CD69, TLR-2, TLR-4 провели на активированных митогеном лимфоцитах, поскольку на нестимулированных лимфоцитах достоверных изменений экспрессии этих рецепторов зарегистрировать не удалось. Вычисляли индекс стимуляции (ИС=A/B, где ИС - индекс стимуляции; А - процент субпопуляций клеток, культивируемых в среде с митогеном и различными концентрациями ЭСЖ; Б - процент субпопуляций клеток, культивируемых в среде RPMI 1640).

Оба ЭСЖ снижали ответ на активацию митогеном Т-лимфоцитов, регистрируемый по экспрессии CD69 рецептора. ИС снижался с 8,4 до 2,4 (ЭСЖГ) и до 3,5 (ЭСЖН).

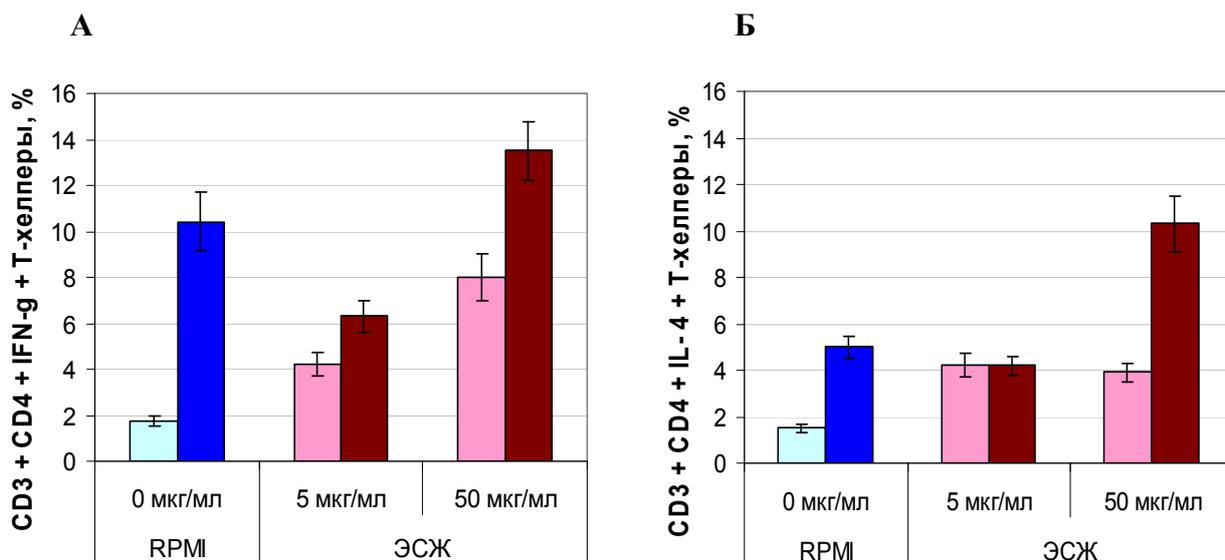
Оценка экспрессии на Т-лимфоцитах TLR рецепторов показала, что лишь ЭСЖН вызывал супрессирующее действие. Снижение ИС достигало статистически значимых значений при концентрации 50 мкг/мл. Так, ИС митогенами субпопуляции CD3+TLR-2+ при добавлении ЭСЖН уменьшался с 3,3 до 1,3, а для субпопуляции CD3+TLR-4+ - с 2,5 до 1,2.

В зависимости от степени насыщения клещей ЭСЖ оказывал противоположное влияние на субпопуляции CD19+В-лимфоцитов. Так повышение концентрации ЭСЖГ с 5 до 50 мкг/мл увеличивало ИС CD19+CD69+В-лимфоцитов с 13,8 до 36,8. В отличие от этого, ЭСЖН в концентрации 50 мкг/мл более чем в 2,5 раза снижал ИС таких клеток. Увеличение субпопуляции CD19+CD69+ под воздействием ЭСЖГ вероятно связано не только с меньшим содержанием супрессирующих компонентов в этом экстракте, но и с тем, что активация В-клеток возможна непосредственно через В-клеточный рецептор (Черешнев и др. 2013; Хаитов, 2006).

В то же время оба ЭСЖ в концентрации 50 мкг/мл уменьшали субпопуляции CD19+TLR2+, но не CD19+TLR4+ В-лимфоцитов. Эти данные свидетельствуют о том, что характер воздействия ЭСЖ отличается для разных субпопуляций CD19+В-лимфоцитов и может меняться в зависимости от степени насыщения клещей.

Иммуномодулирующее действие ЭСЖ *I. persulcatus* через изменение состава лимфоцитов было подтверждено в экспериментах по оценке доли субпопуляций CD3+CD4+ Т-лимфоцитов продуцирующих цитокины IFN- γ и IL-4 (рисунок 3). Как видно из диаграмм ЭСЖГ в концентрации 50 мкг/мл стимулировал увеличение доли субпопуляции CD3+CD4+ Т-лимфоцитов синтезирующих IFN- γ в 4,7 раза, а синтезирующих IL-4 – в 2,6 раза по сравнению с контролем.

Эффект ЭСЖН был более значительным по сравнению с ЭСЖГ: в его присутствии наблюдали увеличение IFN- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в 8 раз, а IL-4 продуцирующих Т-лимфоцитов – в 7 раз по сравнению с контролем.



□ GolgiPlug™; ■ Leukocyte Activation Cocktail и GolgiPlug™; □ -экстракт слюнных желез голодных клещей; ■ -экстракт слюнных желез частично напивавшихся клещей

Рисунок 3 - Изменение процентного содержания Т-хелперов, продуцирующих IFN- γ (А) и IL-4 (Б) в (CD3+CD4+)Т-лимфоцитах под действием экстракта слюнных желез *I. persulcatus*

Снижение доли субпопуляций активированных Т-лимфоцитов и повышение синтеза цитокинов IL-4, подавляет развитие провоспалительных реакций в месте присасывания клеща, благодаря чему создаются благоприятные условия для его насыщения, а за счет иммуномодуляции облегчается проникновение и диссеминация патогенных боррелий в организм позвоночных, что подтверждается литературными данными (Singh et al., 2003; Novius et al., 2008; Балашов, 1998). Кроме того, полученные результаты подтверждают гипотезу о направлении развития иммунного ответа компонентами слюнных желез *I. persulcatus* преимущественно по Th-2 типу (Brossard et al., 2004; Mejri et al., 2001), подобно *I. scapularis*, *I. pacificus* и *I. ricinus*.

Из изложенных результатов следует, что компоненты как ЭСЖГ, так и ЭСЖН оказывают в целом сходное действие на активационные процессы иммунной системы. Однако, более выраженный эффект на активированные субпопуляции Т- и В-лимфоцитов и внутриклеточную экспрессию Т-клетками цитокинов наблюдали в случае ЭСЖН. Исходя из этого, а так же учитывая методологические сложности в получении ЭСЖГ, в дальнейших экспериментах по выявлению иммунного ответа у мышей, сенсibilизированных повторными напусками клещей, использовали только материал от частично-напивавшихся клещей.

Формирование у мышей иммунного ответа на экстракт слюнных желез после повторных напусков клещей

Из литературных данных известно, что существуют значительные отличия в степени формирования резистентности у различных видов лабораторных животных к разным видам иксодовых клещей (Bowessidjaou et al., 1977; Brossard et al., 2004; Trager, 1939; Wikel et al., 1978; Wikel et al., 1997). Тем не менее, в этих работах не освещено развитие резистентности у лабораторных животных (мышей) к исследуемому нами виду клещей *I. persulcatus*, а так же протективность сформированного иммунитета к заражению боррелиями через укус. Мы предположили, что формирование у мышей антиклещевого иммунитета к *I. persulcatus* так же возможно при сенсibilизации повторными напусками клещей, и что у таких мышей

должна развиться устойчивость к заражению боррелиозом при присасывании зараженных клещей.

В результате этого исследования, было четко выявлено развитие иммунного ответа к ЭСЖ у сенсibilизированных мышей, которое выражалось в изменении реакции Т-лимфоцитов не только на ЭСЖН, но и на неспецифический митоген (КонА). ИС у таких стимулированных спленоцитов возрастал с 5,9 % после первого кормления до 21,9 % после третьего. Ингибирующий эффект ЭСЖН *in vitro*, который был установлен в предыдущем исследовании, здесь, наоборот, снижался от некоторого ингибирования после второго напуска клещей до значительной стимуляции после третьего кормления, тогда как после первого кормления клещей - значения сопоставимы с контролем (таблица 1).

При определении количества активированных В-лимфоцитов установили, что уже после первого кормления клещей ИС активированных митогеном лимфоцитов значительно превышал ИС в контроле. При последующих напусках клещей, он несколько снижался, но по-прежнему превышал показатели интактных мышей.

Таблица 1 – Индекс стимуляции субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные рецепторы CD69, в 48-часовой культуре спленоцитов под действием ЭСЖН *I. persulcatus* и митогена

Субпопуляции лимфоцитов	Количество циклов кормления	ИС лимфоцитов на митоген	ИС лимфоцитов на митоген при различных концентрациях ЭСЖ		
			5 мкг/мл	25 мкг/мл	50 мкг/мл
CD3+CD69+Т-лимфоциты контрольных мышей	-	6,9±1,1	2,6±0,9	3,4±0,9	2,9±0,7
CD3+CD69+Т-лимфоциты сенсibilизированных мышей	1-кратно	5,9±1,0	3,1±0,8	3,3±0,9	3,3±0,7
	2-кратно	16,1±1,9	14,0±1,5	11,3±1,4	5,8±0,9
	3-кратно	21,9±2,2	24,3±2,3	23,6±2,5	25,5±2,4
CD19+CD69+В-лимфоциты контрольных мышей	-	10,5±1,5	13,4±1,6	9,2±1,4	5,6±1,0
CD19+CD69+В-лимфоциты сенсibilизированных мышей	1-кратно	25,3±2,5	29,4±2,7	27,3±2,7	14,3±1,5
	2-кратно	16,9±1,8	17,5±1,9	15,2±1,5	9,5±1,3
	3-кратно	19,6±1,9	18,7±1,9	17,9±2,2	12,1±1,5

Примечание: ИС – индекс стимуляции лимфоцитов; ЭСЖ – экстракт слюнных желез клещей *I. persulcatus*

Таким образом, при формировании клеточного иммунного ответа у сенсibilизированных мышей выявили увеличение доли активированных субпопуляций лимфоцитов в ответ на специфический индуктор - ЭСЖН.

При анализе гуморального иммунитета у мышей с помощью ИФА было установлено, что достоверное увеличение концентрации специфических иммуноглобулинов регистрировали только после третьего кормления, которая превышала контрольные показатели в 2 раза (судя по показателю оптической плотности).

Полученные данные об увеличении доли активируемых ЭСЖН субпопуляций лимфоцитов и повышении концентрации специфических иммуноглобулинов к ЭСЖН свидетельствуют о формировании у мышей сенсibilизированных повторными напусками клещей иммунного ответа на ЭСЖ.

Так же на формирование иммунного ответа против клещей в ходе кормления указывает снижение количества напитавшихся и отпавших клещей при каждом последующем напуске. При первом кормлении на 3-4-й день питания отпало 70 % напущенных на животное клещей.

Через это же время количество насытившихся и отпавших клещей, которые питались уже на сенсibilизированных мышах, составило 49 %. Остальные клещи продолжили питание, так как им требовалось больше времени для успешного насыщения из-за препятствий, вызванных специфическими иммунными реакциями сенсibilизированного хозяина. Уменьшение числа отпавших насытившихся нимф является достоверным критерием, подтверждающим формирование антиклещевого иммунитета (Григорьева, 2007; Балашов, 1998; Brossard et al., 2004).

Устойчивость мышей к заражению возбудителями боррелиоза через укус клеща

Для оценки устойчивости к заражению боррелиями мышей, после трехкратного кормления на них клещей, проводили напуск нимф, зараженных либо изолятом *B. afzelii* H13, либо изолятом *B. garinii* Siu. Зараженность оценивали через 6 недель после отпадения насосавшихся клещей по обсемененности боррелиями органов и тканей мышей с помощью ПЦР-РВ и высева образцов.

Пробы инкубировали в среде BSK-II в стационарном режиме при 37⁰ С в течение 4 недель, используя метод глубинного культивирования. Концентрацию боррелий в культуре определяли при помощи темнопольной микроскопии. Наличие бактериального роста регистрировали по изменению цвета среды с розового на желтый.

Как видно из таблицы 2, независимо от вида возбудителя ИКБ количество инфицированных мышей, сенсibilизированных повторными кормлениями на них клещей, снижалось до 20 % при заражении через укус клеща. Органы всех контрольных животных содержали клетки боррелий или ДНК.

Полученные данные по определению устойчивости к заражению сенсibilизированных мышей коррелируют с таковыми по клеточному и гуморальному иммунитету, а так же экспериментам *in vivo*. Результаты указывают на возможность использования показателей клеточных тестов и ИФА как достоверные критерии при определении развития сенсibilизации мышей к клещевым покусам.

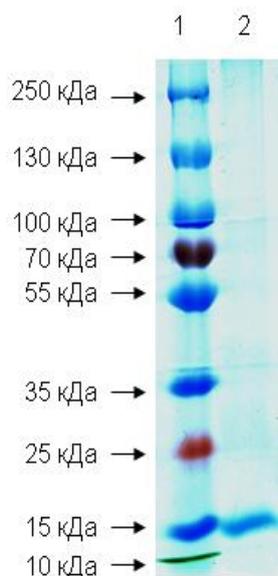
Результаты подтверждают, что белки слюны клещей *I. persulcatus* являются перспективными кандидатами в качестве протективных антигенов.

Таблица 2 - Сравнение обсемененности боррелиями органов у трехкратно-сенсibilизированных и контрольных мышей

Вид боррелий	Группы мышей	% инфицированности тканей и органов (положительными считались образцы с присутствием ДНК (ПЦР-РВ) или культуры боррелий (микроскопия))			
		Ухо	Мочевой пузырь	Сердце	Бедренно-большеберцовый сустав
<i>B. garinii</i> Siu	Контрольная	100	100	100	100
	Сенсibilизированная	10	20	20	0
<i>B. afzelii</i> H13	Контрольная	100	100	100	100
	Сенсibilизированная	10	0	20	0

Исследование иммуногенных и цитотоксических свойств рекомбинантного белка Salp15 клещей *I. persulcatus*

Наработка рекомбинантного белка Salp15 осуществлялась в клетках *E. coli* штамма-продуцента. Анализ Salp15 *I. persulcatus* с помощью электрофореза в 12 % ПААГ показал, что он практически свободен от примесей других белков: чистота препаратов по белку составила 95-98 %. Молекулярная масса Salp 15 – 15,3 кДа (рис. 4).



1 - маркер молекулярной массы;
2 - Salp15

Рисунок 4 - Электрофорез рекомбинантного белка Salp15 в 12 % полиакриламидном геле

Примеси ЛПС при их выявлении в препаратах с помощью окраски ПААГ серебром присутствовали лишь в незначительных количествах (данные не представлены).

Оценка гуморального ответа показала, что после трехкратной иммунизации мышей рекомбинантным белком Salp15 титры специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови составляли 1:51200.

В культуре спленоцитов от иммунизированных белком Salp15 мышей через 24 часа после добавления этого белка в клеточную культуру количество специфически активированных Т-клеток (CD3+CD69+) увеличилось от 2% до 12%, в зависимости от концентрации Salp15. Субпопуляция CD3+CD69+ клеток у интактных мышей при тех же концентрациях достоверно не изменялась (рис. 5 А).

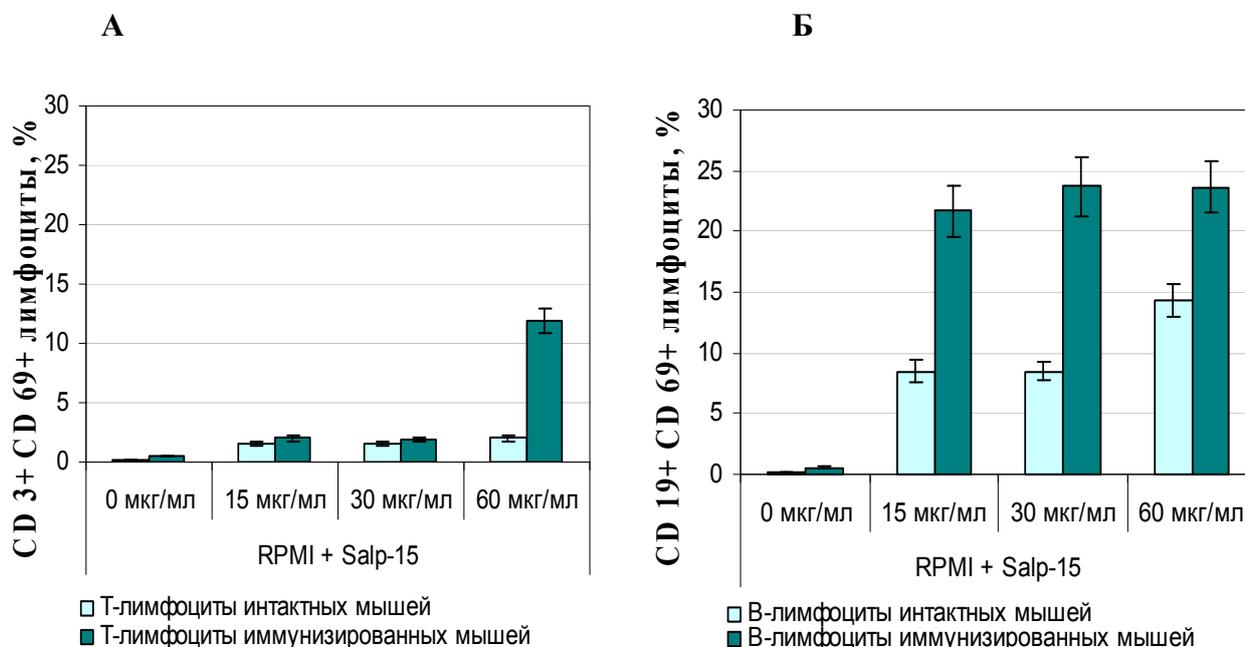


Рисунок 5 - Изменение процентного содержания активированных Т- лимфоцитов (А) и В-лимфоцитов (Б) под действием рекомбинантного белка Salp15 в культуре спленоцитов от сенсibilизированных и интактных животных

Количество специфически активированных В-лимфоцитов (CD19+CD69+) увеличилось до 21,7-23,6 % по сравнению с 8,5 - 14,4 % у В-клеток от интактных мышей (рис. 5 Б).

При исследовании цитотоксического действия рекомбинантного белка Salp15 на спленоциты мышей методом МТТ определили, что белок не оказывал негативного влияния на жизнеспособность клеток в интервале концентраций 1-60 мкг/мл.

Таким образом, иммуно-химические и цитофлуориметрические исследования свойств рекомбинантного белка Salp15 *in vitro* подтверждают, что он обладает выраженной иммуногенностью.

Оценка протективного действия анти-Salp15-антител в модели инфицирования боррелиями через зараженных клещей

Эффективность вакцинации рекомбинантным белком Salp15 определили через 2 недели после введения бустер дозы. Протективный эффект оценили по степени обсемененности боррелиями различных органов и тканей после напуска нимф, инфицированных изолятами *B. afzelii* H13 или *B. garinii* Siu на иммунизированных и контрольных мышей.

По результатам ПЦР-РВ анализа ДНК патогенных боррелий обнаружили в образцах органов и тканей как контрольных, так и иммунизированных животных. Однако обсемененность тканей у мышей, иммунизированных рекомбинантным белком Salp15, была ниже на 40 % по сравнению с контрольной группой животных (рис. 6).

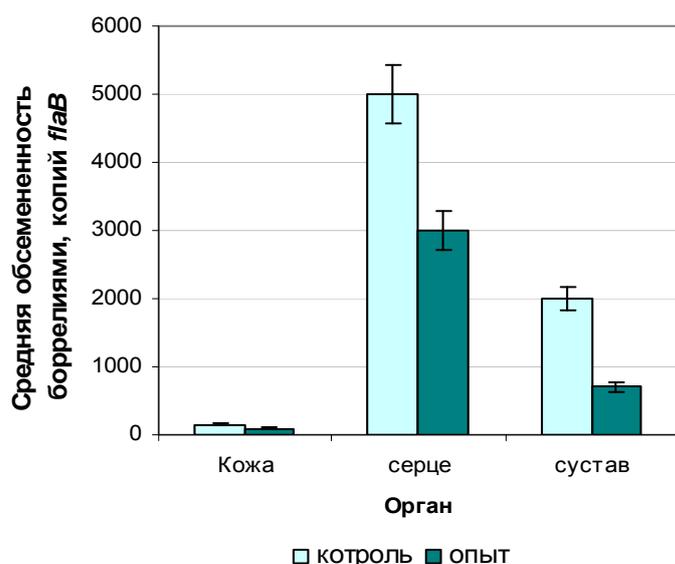


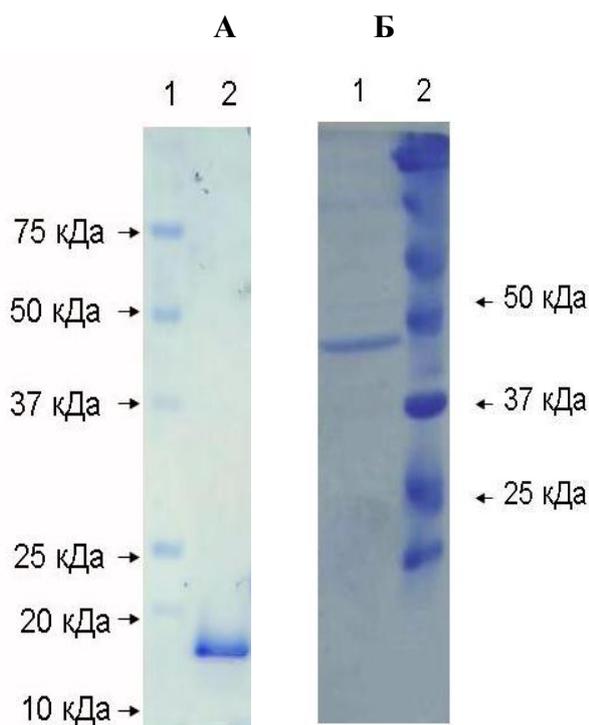
Рисунок 6 - Средняя обсемененность боррелиями тканей и органов мышей после иммунизации рекомбинантным белком Salp15 (определение с помощью ПЦР-РВ по числу копий *flaB*)

Таким образом, иммунизация рекомбинантным белком Salp15 не обеспечивала полной протекции от заражения боррелиями при укусе клеща. Однако, учитывая его иммуногенные свойства и снижение степени инфицированности внутренних органов у иммунизированных животных, можно предложить, что его использование в качестве одного из компонентов поливалентной антиборрелиозной и антиклещевой вакцины весьма перспективно.

Использование антигенов боррелий в клеточных тестах для определения заражения боррелиозом мышей на ранней стадии болезни

Наработка рекомбинантных белков DbpA и ВВК32 осуществлялась в клетках *E. coli* штамма-продуцента. Анализ рекомбинантных Ag боррелий с помощью электрофореза показал, что рекомбинантные белки практически свободны от примесей других белков:

чистота препаратов по белку составила 95-98%. Молекулярная масса белков составила: DbrA *B. afzelii* - 18 кДа; ВВК – 44 кДа (рис. 7).



А: 1 - маркер молекулярной массы; 2 - DbrA; Б: 1 - ВВК; 2 - маркер молекулярной массы

Рисунок 7 - Электрофорез препаратов рекомбинантных белков в 12 % полиакриламидном геле

Примеси ЛПС при их выявлении в препаратах с помощью окраски ПААГ серебром присутствовали лишь в незначительных количествах (данные не представлены).

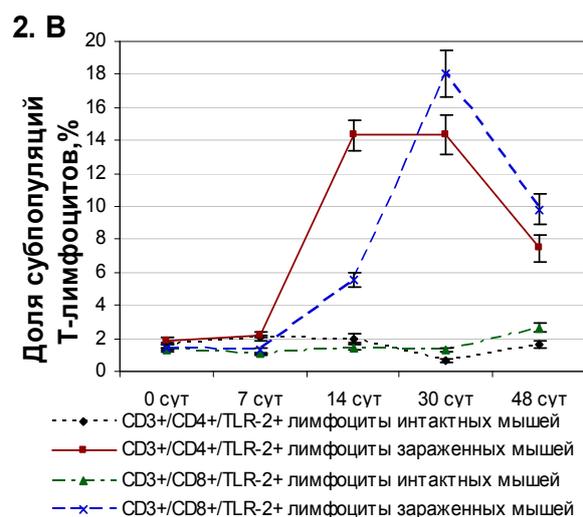
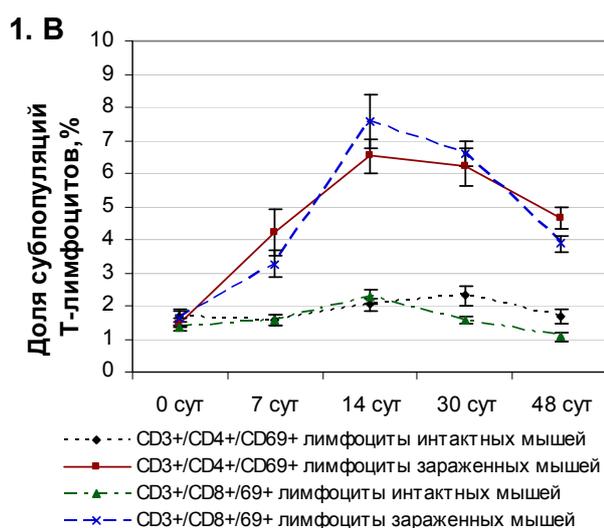
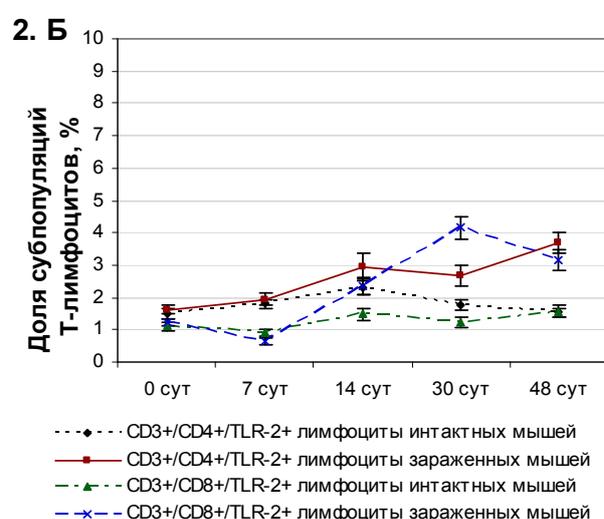
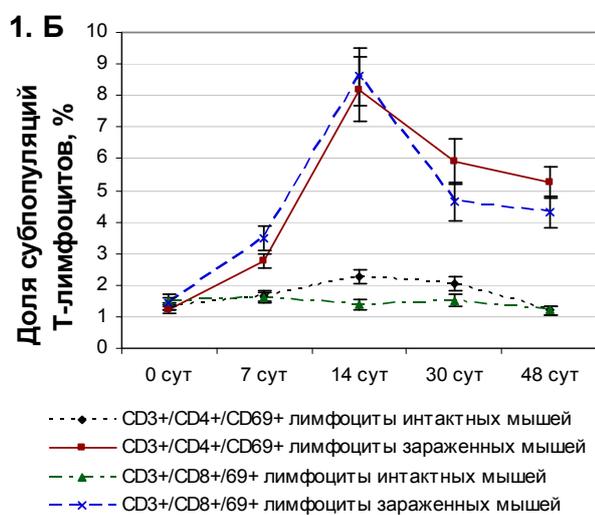
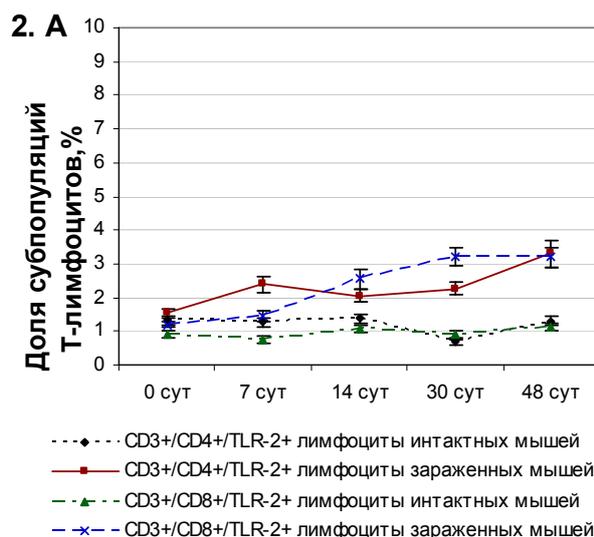
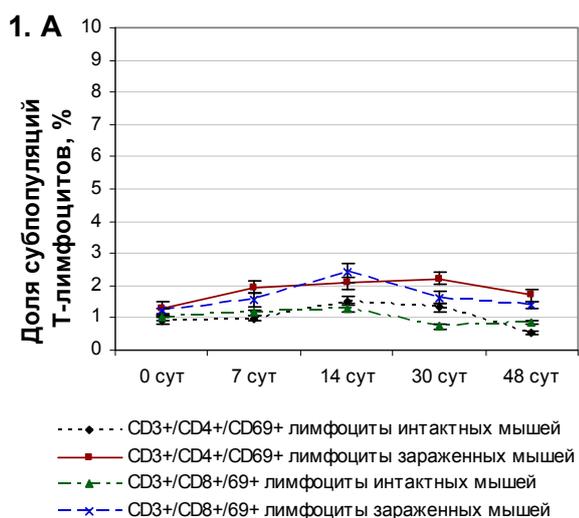
Определение специфической активации лимфоцитов антигенами боррелий

В эксперименте исследовали действие боррелиозных антигенов на различные субпопуляции лимфоцитов в культуре спленоцитов мышей. Добавление к культурам спленоцитов синтетического пептида из 26 аминокислот, являющего иммунодоминантной частью белка VlsE и полного клеточного антигена боррелий не давало достоверных и воспроизводимых результатов в течении первых 48 дней развития инфекции у мышей. Поэтому в дальнейших исследованиях использовались только антигены ВВК32 и DbrA.

При отсутствии в культуральной среде боррелиозных антигенов в культурах спленоцитов от инфицированных мышей установили увеличение в 1,3-3,6 раза количества активированных цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов с CD69 и TLR-2 рецепторами по сравнению с контрольной группой животных. Такие показатели регистрировали на протяжении всех сроков исследования: на 7-е, 14-е, 30-е, 48-е сутки после заражения животных (рис. 8: 1.А и 2.А).

При культивировании спленоцитов от интактных мышей с рекомбинантными белками боррелий ВВК32 или DbrA доля хелперных и цитотоксических лимфоцитов с CD69 и TLR-2 рецепторами не превышала 2,3 % и 2,7 %, соответственно. У инфицированных мышей, количество активированных ВВК32 или DbrA цитотоксических CD8+CD69+ и хелперных CD4+CD69+ лимфоцитов к 7 суткам повышалось примерно в 2 раза, а на 14-е – 48-е сутки - в 3-4 раза (рис. 8: 1.Б и 1.В).

Для лимфоцитов, полученных начиная с 14 дня после инфицирования животных, при добавлении в культуральную среду DbrA определили увеличение количества хелперных клеток несущих TLR-2 рецепторы в 2,3-7,0 раз, а цитотоксических лимфоцитов — в 2,2-5,6 раз по сравнению с такими же культурами лимфоцитов, но без стимуляции. Максимумы эти значения достигали на 14-е – 30-е сутки после заражения.

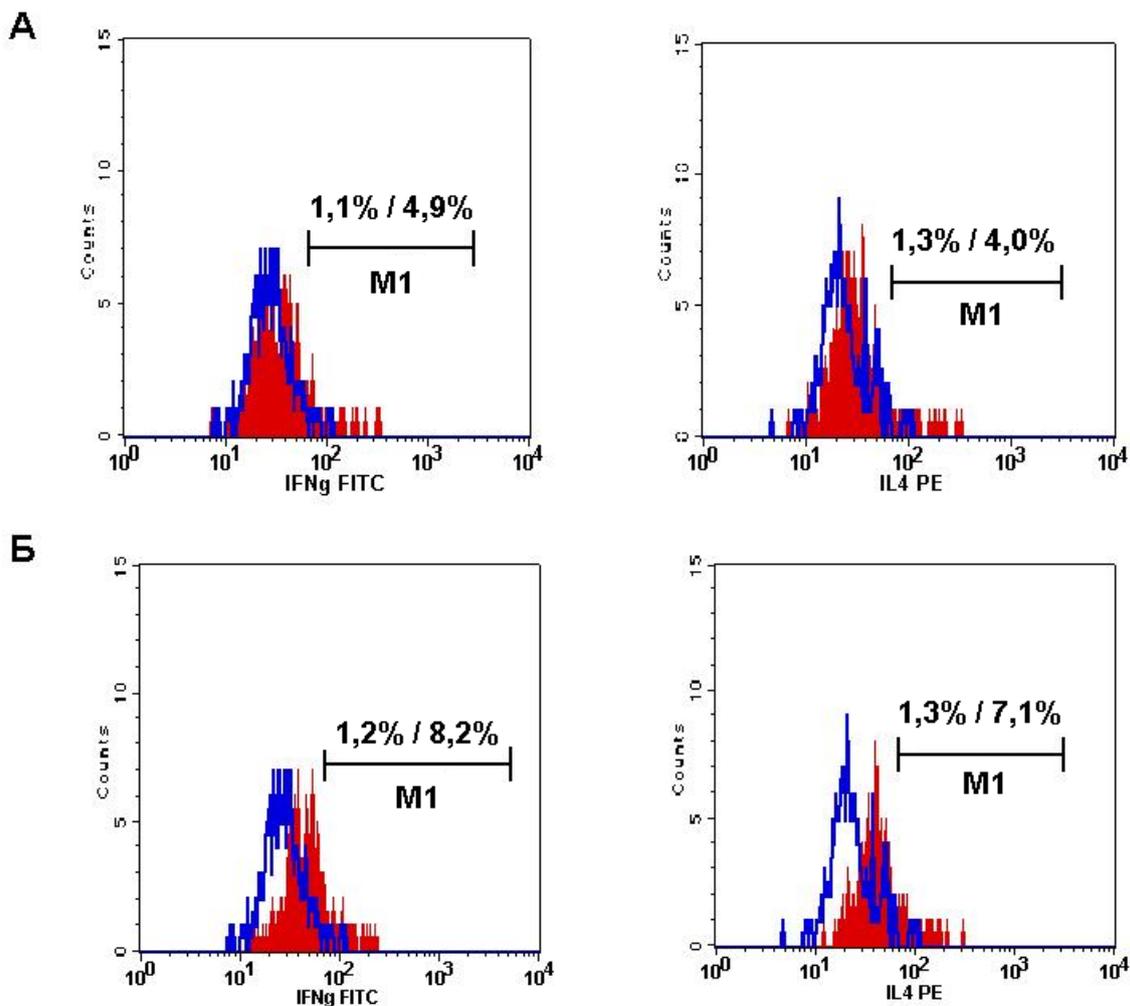


А – в среде RPMI-1640 (контроль); Б – в присутствии в культуральной среде BVK32; В – в присутствии в культуральной среде DbrA

Рисунок 8 - Динамика изменения относительного количества субпопуляций Т-лимфоцитов в культуре спленоцитов от интактных и зараженных *Borrelia afzelii* Н-13 мышей

Присутствие ВВК32 в клеточной культуре сопровождалось увеличением аналогичных субпопуляций Т-лимфоцитов не более чем в 1,4 раза (рис. 8: 2.Б и 2.В).

В случае тестирования боррелиозных Аг на способность специфически стимулировать увеличение синтеза Т-хелперами цитокинов IFN- γ и IL-4 выявили, что присутствие DbrA и ВВК32 в культуре спленоцитов от зараженных мышей приводило к достоверному увеличению продукции этих цитокинов. Более выраженный эффект регистрировали в присутствии антигена DbrA. На протяжении с 14-х и до 48-х суток после заражения боррелиозом количество субпопуляций Тх-1 и Тх-2 при добавлении ВВК32 достигало 4,9 % и 4,0 %, а антигена DbrA - 8,2 % и 7,1 %, соответственно, что отражено на цитограммах (рис. 9). При отсутствии Аг в клеточной культуре доля Тх-1 и Тх-2 составляла 1,1-1,3 %.



А – в присутствии в культуральной среде ВВК32; Б – в присутствии в культуральной среде DbrA. Отношение числа клеток (ось ординат) к распределению интенсивности флуоресценции (ось абсцисс). Отрезок M1 показывает относительное количество клеток (%) в культуральной среде с Аг (заполненная цитограмма) и без Аг (пустая цитограмма). 14 сутки после заражения

Рисунок 9 – Изменение *in vitro* при специфической активации боррелиозными Аг процентного содержания Т-хелперов, продуцирующих IFN- γ и IL-4 в популяции (CD3+CD4+)Т-лимфоцитов мышей, зараженных *B. afzelii* Н-13

Таким образом, результаты исследования указывают на то, что при специфической активации на ранних сроках инфицирования мышей патогенными боррелиями наблюдается увеличение субпопуляций Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD69, TLR-2 рецепторы и цитокины: IFN- γ , IL-4. Все это указывает на возможность использования рекомбинантных антигенов DbpA и ВВК32 и субпопуляций лимфоцитов CD3+CD8+CD69+; CD3+CD4+CD69+; CD4+IFN- γ +; CD4+IL-4+ для ранней диагностики ИКБ в клеточных тестах *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы доказано иммуномодулирующее действие ЭСЖ *I. persulcatus*. Достоверные изменения регистрировали в субпопуляционном составе лимфоцитов, несущих рецепторы CD69, TLR-2 и TLR-4, в уровне синтеза Т-хелперами IFN- γ и IL-4, в снижении продукции IL-12, TNF- α , IL-10 и NO макрофагами. Показана зависимость эффекта от концентрации белковых компонентов ЭСЖ, а также от того голодные или частично напитавшиеся клещи служили источником для получения ЭСЖ. В процессе питания компоненты слюны клещи *I. persulcatus*, вероятно, так же способствуют развитию иммунного ответа преимущественно по Th-2 типу, что показано для клещей *I. scapularis*, *I. pacificus* и *I. ricinus*.

Подтверждено, что компоненты слюны клещей *I. persulcatus* являются перспективными кандидатами в качестве протективных антигенов, так как у сенсibilизированных мышей повторными кормлениями клещей развивается антиклещевой иммунитет, который может оказывать значительную протекцию от боррелиоза при заражении через укус клеща.

Определены иммуногенные и протективные свойства рекомбинантного белка Salp15 слюнных желез *I. persulcatus*. Показано, что иммунизация Salp15 вызывает повышение уровня специфических иммуноглобулинов и снижение на 40 % уровня обсемененности боррелиями внутренних органов мышей в модели инфицирования боррелиями через зараженных клещей.

Полученные нами экспериментальные данные имеют значение при дальнейших исследованиях патогенеза клещевых инфекций на начальных этапах взаимодействия переносчик-хозяин, на которых происходит проникновение и диссеминация боррелий. Результаты проведенной работы полезны при разработке вакцин, принцип действия которых основан на блокировании процесса передачи возбудителя из организма переносчика в организм хозяина.

Установлено, что рекомбинантные антигены DbpA и ВВК32 *B. afzelii* H13 вызывают специфическую активацию лимфоцитов мышей зараженных боррелиями, что можно использовать в качестве дополнительного теста для ранней *in vitro* диагностики ИКБ.

ВЫВОДЫ

1. Экстракт слюнных желез (ЭСЖ) клещей *I. persulcatus* оказывает иммуномодулирующее действие на звенья клеточного иммунитета мышей, что проявляется в уменьшении продукции цитокинов IL-12, TNF- α , IL-10 и снижении образования NO фагоцитами, изменении количества активированных лимфоцитов и цитокин-продуцирующих популяций T α -1 и T α -2.

2. После сенсibilизации трехкратным кормлением незараженных клещей *I. persulcatus* у мышей формируется антиклещевой иммунитет, который можно оценить *in vitro* по изменению индекса стимуляции (в ответ на присутствие в среде антигенов) субпопуляций CD3+CD69+ и CD19+TLR-2+ и по увеличению уровня специфических IgG к ЭСЖ напитававшихся клещей. В этом случае 80 % сенсibilизированных к белковым компонентам ЭСЖ животных становятся невосприимчивыми к возбудителям ИКБ при укусе зараженных клещей.

3. Рекомбинантный белок Salp15 обладает иммуногенностью, что выражается в индукции клеточного и гуморального иммунитета. Протективные свойства белка проявляются в частичной защите мышей от инфицирования возбудителем ИКБ через зараженных клещей. Следовательно, белок Salp15 является перспективным кандидатом при разработке поливалентных антиборрелиозных и антиклещевых вакцин.

4. Рекомбинантные антигены боррелий *B. afzelii* H13 DbpA и BVK32 вызывают *in vitro* специфическую активацию лимфоцитов у инфицированных возбудителями ИКБ мышей, что можно выявить по изменениям в субпопуляциях CD3+CD8+CD69+; CD3+CD4+CD69+; CD4+IFN- γ +; CD4+IL-4+. Этот результат предлагается использовать для создания тест-систем в целях ранней диагностики ИКБ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

а) статьи:

1. **Зырина, Е.В.** Иммуномодулирующее действие экстракта слюнных желез иксодовых клещей *Ixodes persulcatus* (Ixodidae) на лимфоциты мышей линии BALB/c в системе *in vitro* / **Е.В. Зырина**, В.В. Фирстова, А.В. Штанников, Г.М. Титарева, В.П. Гутова, И.С. Васильева, С.Ф. Бикетов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2012. - № 4. С. 33- 35.

2. **Зырина, Е.В.** Применение рекомбинантных антигенов *Borrelia afzelii* в клеточных тестах *in vitro* для оценки специфического иммунного ответа на мышинной модели клещевого боррелиоза / **Е.В. Зырина**, А.В. Штанников, Е.А. Панферцев, Г.М. Титарева, В.В. Мочалов, В.В. Фирстова, И.Ю. Щит, С.Ф. Бикетов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013. - №4 (71). С.34-39.

3. **Зырина, Е. В.** Исследование иммунного ответа у мышей линии BALB/c при многократном питании на них клещей *Ixodes persulcatus* / **Е.В. Зырина**, А.В. Штанников, И.С. Васильева, В.П. Гутова, В.В. Фирстова, О.Н. Перовская, С.Ф. Бикетов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013. - №5 (72). С. 36-40.

б) другие публикации:

4. Firstova, V. *Ixodes persulcatus* tick salivary gland extract (SGE) inhibits IL-4 and IFN- γ secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes / V. Firstova, S. Biketov, **E. Zyrina**, A. Shtannikov, I. Vasiljeva // International Journal of Infectious Diseases, Vol. 14, Supplement 1, March 2010, Page e301.

5. **Зырина, Е.В.** Влияние экстракта слюнных желез *Ixodes persulcatus* на митогенактивированные Т-лимфоциты мышей линии BALB/c в системе *in vitro* / **Е.В. Зырина**, В.В. Фирстова, С.Ф. Бикетов // Тезисы из материалов научно-практической

школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора. - 2010. - С. 273-274.

6. **Зырина, Е.В.** Модулирование экстрактом слюнных желез *Ixodes persulcatus* митогениндуцированной активации лимфоцитов интактных мышей линии BALB/c в системе *in vitro* / **Е.В. Зырина**, В.В. Фирстова, С.Ф. Бикетов // Тезисы из материалов 14-ой Пущинской международной школы-конференции молодых ученых. - 2010. –Т. 1. - С.130.

7. **Зырина, Е.В.** Разработка диагностической системы выявления боррелиоза на основе оценки специфической активации Т-лимфоцитов *in vitro* в ответ на антигены *Borrellia burgdorferi* / **Е.В. Зырина**, В.В. Фирстова, С.Ф. Бикетов // Тезисы из сборника трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Молекулярная диагностика. – 2010. Т III. - С. 62-63.

8. **Зырина, Е.В.** Оценка иммуномодулирующего действия экстракта слюнных желез клещей *Ixodes persulcatus* методами цитометрии / **Е.В. Зырина**, В.В. Фирстова, А.В. Штанников, Г.М. Титарева, С.Ф. Бикетов // Тезисы из сборника «2-я Международная школа по практической проточной цитометрии». – 2011. С 70-71.

9. **Зырина, Е.В.** Оценка влияния рекомбинантного белка Salp-15 клещей *Ixodes persulcatus* на лимфоциты мышей линии BALB/c в системе *in vitro* / **Е.В. Зырина**, В.В. Фирстова, А.В. Штанников, Г.М. Титарева, В.В. Мочалов, Е.А. Панферцев, С.Ф. Бикетов // Тезисы из материалов 16-ой Пущинской международной школы-конференции молодых ученых. – 2012. - С. 414.

10. Фирстова, В.В. Выявление маркеров активации лимфоцитов для диагностики боррелиоза в системе *in vitro* / В.В. Фирстова, **Е.В. Зырина**, А.В. Штанников, И.Ю. Щит, С.Ф. Бикетов // Тезисы из материалов III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». - 2012. - С. 316.

11. **Зырина, Е.В.** Оценка влияния рекомбинантных белков ВВК-32, DbpA *Borrelia afzelii* на лимфоциты мышей линии BALB/c в системе *in vitro* / **Е.В. Зырина**, В.В. Фирстова, А.В. Штанников, В.В. Мочалов, Е.А. Панферцев, С.Ф. Бикетов // Российский иммунологический журнал. Апрель-Сентябрь, 2013. – Т 7 (16). - № 2-3. - С. 248.

Благодарности

Моим руководителям – к.б.н. Бикетову С.Ф. и д.б.н. Игнатову С.Г. за помощь в выполнении диссертационной работы;

Научным рецензентам к.б.н. Шанникову А.В. и к.м.н. Титаревой Г.М. за внимательное прочтение моей диссертационной работы и ценные замечания, а так же за помощь в выполнении работы и консультации;

Сотрудникам Научно-исследовательского института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского (г. Москва) – с.н.с., к.б.н. Васильевой И.С., к.м.н. Гутовой В.П., Гальченко С.С. за помощь в организации проведения экспериментов и консультации;

Сотрудникам отдела иммуно-биохимии патогенных микроорганизмов – с.н.с., к.б.н. Панферцеву Е.А., н.с. Мочалову В.В., с.н.с., к.б.н. Щит И.Ю., н.с. Решетняк Т.В., н.с. Реполовской Т.В., зав. сектором, к.б.н. Фирстовой В.В. и зав. сектором, к.б.н. Штанникову А.В. за предоставленные материалы для экспериментальной работы и участие в проведенных исследованиях.

ФБУН ГНЦ ПМБ, в лице директора, член-корр. РАН, профессора Дятлова И.А., за предоставленную возможность выполнения данной диссертационной работы.