

**Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации
Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»**

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)

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
Бикетов Сергей Федорович,
кандидат биологических наук

Научный консультант:
Игнатов Сергей Георгиевич,
доктор биологических наук

Оболенск-2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	26
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	26
1.1. Иксодовые клещи – переносчики трансмиссивных заболеваний.....	26
1.2. Особенности функционирования слюнных желез иксодовых клещей.....	27
1.3. Морфологические изменения в месте питания клещей	28
1.4. Влияние компонентов слюны клещей на развитие иммунных реакций хозяина	29
1.5. Специфическая противоклещевая резистентность.....	33
1.6. Другие факторы, влияющие на противоклещевой иммунитет.....	35
1.7. Перспективы создания антиклещевых вакцин.....	36
1.8. Особенности взаимодействия клещ-возбудитель-хозяин.....	38
1.8.1. Адаптации возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов в организме клеща.....	38
1.8.2. Адаптации возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов в организме теплокровного хозяина.....	39
1.9. <i>Borrelia burgdorferi</i> и развитие инфекционного процесса.....	41
1.10. Использование иммунологических методов в исследованиях иммунопатогенеза иксодовых клещевых боррелиозов.....	44
1.11. Диагностика иксодовых клещевых боррелиозов.....	46
1.11.1. Актуальность разработки иммунодиагностического клеточного теста.....	48
1.12. Заключение по обзору литературы.....	49
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	50
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	50

ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ <i>IXODES PERSULCATUS</i> НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C.....	50
2.1. Характеристика экстракта слюнных желез.....	50
2.2. Влияние экстракта слюнных желез <i>I. persulcatus</i> на жизнеспособность иммунокомпетентных клеток.....	52
2.3. Оценка <i>in vitro</i> влияния экстракта слюнных желез на макрофаги мышей.....	54
2.4. Оценка <i>in vitro</i> воздействия экстракта слюнных желез <i>I. persulcatus</i> на клетки адаптивного иммунитета интактных мышей.....	56
ГЛАВА 3. ФОРМИРОВАНИЕ У МЫШЕЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАРАЖЕНИЮ БОРРЕЛИОЗОМ ПОСЛЕ ПОВТОРНЫХ НАПУСКОВ КЛЕЩЕЙ.....	62
3.1. Оценка <i>in vitro</i> формирования у мышей иммунного ответа на экстракт слюнных желез.....	62
3.2. Оценка <i>in vivo</i> антиклещевого иммунитета у мышей.....	67
3.3. Устойчивость мышей к заражению возбудителями боррелиоза через укус клеща.....	69
ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА КЛЕЩЕЙ <i>I. PERSULCATUS</i> SALP15 И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ИММУНОГЕННЫХ, ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ.....	72
4.1. Получение и характеристика по чистоте рекомбинантного белка Salp15.....	72
4.2. Изменение активности генов слюнных желез <i>I. persulcatus</i> в зависимости от стадии питания клещей.....	74
4.3. Исследование <i>in vitro</i> иммуногенных и цитотоксических свойств рекомбинантного белка Salp15 клещей <i>I. persulcatus</i>	76

4.4. Опсонизация рекомбинантным белком Salp15 <i>I. persulcatus</i> поверхности боррелий.....	77
4.5. Оценка протективного действия анти-Salp15-антител в модели инфицирования боррелиями через зараженных клещей.....	79
ГЛАВА 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИГЕНОВ БОРРЕЛИЙ В КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТАХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАРАЖЕНИЯ БОРРЕЛИОЗОМ МЫШЕЙ НА РАННЕЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ.....	81
5.1. Получение и характеристика по чистоте рекомбинантных белков DbpA и ВВК32.....	81
5.2. Определение специфической активации лимфоцитов антигенами боррелий.....	83
5.3. Определение цитокинового профиля инфицированных мышей.....	86
5.4. Определение изменений в уровне синтеза цитокинов Т-хелперами, при их специфической активации антигенами боррелий.....	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	90
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	96
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	122
БЛАГОДАРНОСТИ.....	125

ВВЕДЕНИЕ

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 [61; 100; 176; 204].

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 [115; 148; 172; 179; 190; 192]. 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 [81; 99; 106; 140; 175; 203].

Подобная модуляция иммунных реакций хозяина в месте укуса клеща облегчает проникновение, выживание и диссеминацию патогенных боррелий в организме позвоночных [89; 106; 115; 176]. 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).

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 [61; 115; 193]. К числу таких кандидатных белков, которые могут быть использованы при создании антиклещевых вакцин, относятся, например, серпины [158], лонгистатины [41, 42], липокалины [129] и суболезины [68]. 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 [116; 40; 161]. Кроме этого, установлено увеличение экспрессии *salp15* генов у клещей *I. persulcatus* на начальных этапах

кормления [29; 30; 114], что позволяет рассматривать белок Salp15 в качестве перспективного кандидата для создания вакцин против ИКБ [161; 186; 115].

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 [33; 214].

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 хозяина, существенные для защиты от боррелиозной инфекции.

Задачи исследования:

1. Оценить иммуномодулирующее действие экстракта слюнных желез (ЭСЖ) клещей *I. 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 (Th-1/Th-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 26.09.2012г., 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

Объекты исследования

Лабораторные животные

В экспериментах использовали беспородных и линейных BALB/c мышей в возрасте 10-12 недель и весом 18-20 г, 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.

Микробиологические методы

Культивирование боррелий

Наработку биомассы боррелий, культивирование спирохет из клещей и зараженных животных проводили методом глубинного культивирования в пластиковых одноразовых пробирках, используя среду BSK-II [46], 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 мг/л, амфотерицин В – 2,5 мг/л, фосфомицин – 20 мг/л, ципрофлоксацин – 0,5 мг/л.

Культуры инкубировали в стационарных условиях при температуре 37°C в термостате в течение 4 недель. Визуальный контроль проводили каждые 4-5 дней. Наличие бактериального роста регистрировали по изменению цвета среды с розового на желтый. Концентрацию боррелий в культуре определяли при помощи темнопольной микроскопии (микроскоп Olympus BX 41).

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.

Получение инфицированных клещей

Беспородных мышей заражали подкожно в области спины российскими иолятами боррелий *B. garinii* Siu и *B. afzelii* H13 в дозе 10^6 боррелий на мыш. Спустя 28 дней после заражения, исследовали биоптаты из ушной раковины

методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). В случае подтверждения инфицированности мышей боррелиями на них напускали по 200-300 личинок *I. persulcatus* на каждую особь. Сформировавшихся после линьки инфицированных нимф использовали для определения устойчивости к заражению сенсibilизированных мышей. Подтвержденная с помощью ПЦР-РВ инфицированность нимф при моделировании инфекции составляла 70-80 % для *B. garinii* Siu и 85-90 % для *B. afzelii* H13.

Получение экстракта слюнных желез

Слюнные железы голодных и частично-напитавшихся (в течение 72 часов) самок *I. persulcatus* извлекали под бинокуляром с помощью препаровальных игл в охлажденный стерильный фосфатно-солевой буфер (ФСБ) на льду, затем гомогенизировали на ультразвуковом дезинтеграторе («VirSonic 100») 10 циклами озвучивания (30 с – импульсы, 30 с – перерыв) на ледяной бане. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при скорости вращения 10000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4°C. Супернатанты пропускали через фильтр с диаметром пор 0,20 мкм (Corning®). Экстракты хранили в аликвотах при температуре минус 80°C.

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

Иммунизация мышей рекомбинантным белком Salp15

Животных иммунизировали рекомбинантным белком Salp15 трехкратно с интервалом 3 недели. Первую иммунизацию проводили Salp15 растворенным в ФСБ и эмульгированным с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) в

дозе 100 мкг/мышь подкожно. Вторую иммунизацию – аналогично, но с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ). При третьей иммунизации Salp15, растворенный в ФСБ без адъюванта вводили внутривентриально в дозе 10 мкг/мышь. Материал от иммунизированных животных забирали для исследований через неделю после третьей иммунизации.

Сенсибилизация мышей компонентами слюны клещей

Мышей сенсибилизировали путем повторных кормлений на них незараженных *I. persulcatus* нимф из чистой лабораторной культуры (30 нимф/мышь). На животных надевали воротник из тонкого картона и помещали в стеклянную банку объемом 1 л с фильтровальной бумагой на дне. 30 нимф кисточкой переносили на спину мыши. Банку закрывали мягкой мелкой металлической сеткой и закрепляли резиновым хватом. Через сутки мышей переносили в клетки из металлической сетки, находящиеся над кюветами с водой. Нимфы питались до полного насыщения и отпадения. Интервал между напусками составлял 3 недели.

Модель боррелиозной инфекции на мышах

Для заражения мышам подкожно вводили в область спины чистую культуру российских изолятов боррелий *Borrelia afzelii* H13 в дозе 10^6 боррелий на мышь в 50 мкл 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 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. burgdorferi*. Для синтеза фрагмента гена *flab* использовали праймеры: прямой (FL-571F) – 5'-gcagctaattgttgc aaatcttttc-3', обратный (FL-677R) – 5'-gcagggtgctggctgttga-3' и TaqMan-зонд (FL-611P) – 5'-FAM-aaactgctcaggctgcaccgggttc-RTQ-1-3'. Параметры амплификации: инкубация в течение 10 мин при температуре 95°C, далее 40 циклов денатурации в течение 15 с при температуре 95°C и отжига-элонгации в течение 1 мин при температуре 60°C, детекция флуоресценции после каждого этапа элонгации. Амплификацию проводили на приборе MiniOpticon (BioRad), используя «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой и ингибирующими активностью фермента антителами в присутствии референсного красителя ROX» (Синтол). Флуоресценцию детектировали по каналу FAM. Для получения стандартной кривой использовали ДНК, выделенную из суспензий боррелий, с известными концентрациями. Анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Opticon Monitor.

Зондовая микроскопия боррелий и белка Salp15

1 мл (10^6 клеток/мл) культуры *B. afzelii* Н-13 отмывали 3-х кратно в деионизированной воде путем центрифугирования при скорости вращения 10000 об/мин в течение 10 мин. К образцам добавляли рекомбинантный Salp15 (100 мг/л), с последующей экспозицией 30 мин при комнатной температуре и 3-х кратной отмывкой в деионизированной водой. Визуализацию образцов проводили бесконтактным методом на сканирующем зондовом микроскопе SmartSPM, позволяющем провести исследования поверхности различных объектов с нанометровым разрешением, согласно инструкции производителя (ООО «Аист-НТ»).

Методы препаративной биохимии

Получение антигенов для специфической активации лимфоцитов

Рекомбинантные белки Salp15, ВВК32 и DbpA были наработаны с использованием штаммов-продуцентов *E.coli*, сконструированных ранее с.н.с. Панферцевым Е.А. в отделе иммунобиохимии ФБУН ГНЦ ПМБ и затем очищены с помощью афинной 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 озвучиванием на аппарате “VirSonic 100” (10 циклов озвучивания на ледяной бане: 30 с – импульсы, 30 с – перерыв), с последующим центрифугированием при скорости вращения 15000 об/мин в течение 20 мин при температуре 4°C.

Чистоту и молекулярную массу белков оценивали с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) [131], а примеси ЛПС в исследуемых препаратах выявляли при помощи окрашивания серебром [87].

Определение концентрации белков

Определение содержания суммарного белка экстракта слюнных желез, рекомбинантного белка Salp15, суммарного клеточного антигена боррелий, рекомбинантных (DbpA, ВВК32) и синтетического (VLS_E) антигенов боррелий в пробе проводили при помощи набора Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (SIGMA, США) по прилагаемой к нему инструкции. Результаты регистрировали на планшетном анализаторе VICTOR™X3, (PerkinElmer, Финляндия), с использованием программы WorkOut 2,5, согласно инструкции производителя.

Определение активности генов *salp* слюнных желез клещей

Слюнные железы из клещей препарировали в течение 20-30 мин после снятия с хозяина. Извлеченные образцы быстро промывали в трех сменах 10 мМ HEPES буфера (pH 7,4) и немедленно помещали в 250 мкл RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen) по 10-50 пар. РНК из слюнных желез экстрагировали с помощью гуанидин-изотиоцианатного буфера с последующей очисткой фенолом и хлороформом [115]. Полученная РНК была транскрибирована в одноцепочечную кДНК с помощью обратной транскриптазы, праймеров CDSIII/3' и SMART IV™, смеси dNTP и буфера из SMART-набора для получения кДНК (BD Clontech, Palo Alto, CA, USA). Оценку экспрессии генов на разных стадиях питания клеща проводили при добавлении в реакционную смесь для ПЦР вместе с геноспецифическими праймерами несколько последовательных десятикратных разведений одноцепочечной кДНК, наработанной с одинакового количества РНК. Уровень экспрессии определяли по количеству амплифицированной двухцепочечной кДНК. Для этого после электрофореза в 1,5 % агарозе с бромистым этидием гели сканировали и денситометрировали с помощью аппарата Gel Doc XR V. 4.6.5 (Bio-Rad). Геноспецифические праймеры для амплификации двухцепочечной кДНК, были рассчитаны на основе имеющихся в базах Genbank и NCBI последовательностях: *salp10* (AF278575), *salp15* (AF209914) для *I. scapularis*.

В качестве репера для нормирования экспрессии генов использовали кДНК, полученную при амплификации части гена β -актина, важного структурного компонента секреторных тканей [146].

Методы первичной культуры эукариотических клеток *in vitro*

Получение первичной культуры лимфоцитов

Мышей линии BALB/c эвтаназировали ингаляцией CO₂, стерильно вскрывали брюшную полость и изолировали селезенки в среду 199. Далее

селезенки стерильно гомогенизировали через капроновый фильтр в среду 199 с 40 мг/л гентамицина и 5 % БСА. Полученную суспензию 2х отмывали средой того же состава центрифугированием в течение 8 мин при скорости вращения 1300 об/мин. Осадок ресуспендировали в ППС. Далее оценивали жизнеспособность клеток, окрашивая 0,4 % раствором трипанового синего, проводя подсчет на Автоматическом счетчике клеток (Countess™, Invitrogen™); при этом она составила 95 %.

Количество жизнеспособных спленоцитов доводили до концентрации 2×10^6 клеток/мл и вносили в плоскодонный 96-луночный планшет для культур тканей (конечный объем 200 мкл/лунка). Клеточную суспензию спленоцитов использовали как источник лимфоцитов. Спленоциты культивировали в среде RPMI, присутствии митогена (КонА (5 мг/л) или ЛПС (10 мг/л) (SIGMA)) и/или Аг при температуре 37 °С, во влажной атмосфере 5 % CO₂ в течение 24-72 ч в зависимости от условий эксперимента.

В случае выявления внутриклеточных цитокинов IFN- γ и IL-4 в образцы за 4 часа до окончания инкубирования вносили BD GolgiPlug™, а в положительный контроль – BD Leukocyte Activation Cocktail с GolgiPlug™. Препараты содержат ингибитор транспорта белков.

Получение макрофагов из клеток костного мозга

Костномозговые клетки получали путем промывания полости бедренной кости при помощи шприца средой DMEM, содержащей 100 мг/л гентамицина. Полученную взвесь клеток костного мозга отмывали средой того же состава центрифугированием (в течение 10 мин, при скорости вращения 1300 об/мин), доводили концентрацию клеток до 2×10^6 клеток/мл и вносили в плоскодонный 96-луночный планшет для культур тканей по 100 мкл/лунку. Для получения макрофагов клеточную культуру инкубировали в среде для КММ (DMEM с 10 % БСА, 10 % L-929-среды (с GM-CSF), 1 % 10 мМ L-глутамина, 1 мл 1% MEM non-essential amino acids (100-х сток-раствор), 1 мл 1 % HEPES буфера, 50 мг/л гентамицина) при температуре 37 °С, во влажной атмосфере 5 % CO₂. Меняли

среду каждые 2-3 дня. После того, как КММ сформировали монослой (через 6-8 дней), использовали в эксперименте.

Перед добавлением Аг боррелий (суммарный клеточный антиген изолята *B. afzelii* Н-13) в концентрации 10 мг/л, клеточную культуру проинкубировали 2 часа с ЭСЖН *I. persulcatus* (20 мг/л). Анализ IL-12, TNF- α , IL-10, NO в супернатантах проводили через 24 ч после стимуляции Аг.

Определение продукции КММ цитокинов и NO

Концентрацию цитокинов IL-12, TNF- α , IL-10 и NO в супернатантах культур КММ определили с помощью коммерческих 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 прилагаемым к ним инструкциям.

Оптическую плотность регистрировали в лунках планшета при длине волны 492 нм (для цитокинов) и 550 нм (для NO) с использованием программы WorkOut 2,5 на планшетном анализаторе VICTOR™X3 («PerkinElmer», Финляндия). На основании шкалы стандартов определяли количество IL-12, TNF- α , IL-10 и NO в образцах.

Иммуноферментный анализ

Определение титра специфических антител (IgG)

Образцы сывороток мышей анализировали с помощью твердофазного ИФА [10]. Антигенный препарат (ЭСЖ/Salp15) в концентрации 10 мг/л в 0,1 М натрий-карбонатном буфере (pH 9,6) адсорбировали в 96-луночных планшетах (High binding «Greiner bio-one», Германия) в течение ночи, при температуре 4 °С. Для отмывки планшета готовили 0,1 М раствор ФСБ, содержащий 0,05 % Tween-20 (1 л: гидрофосфат натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) –

4,94 г; дигидрофосфат натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) – 0,6 г; хлорид натрия (NaCl) – 8,7 г; Tween-20 – 0,5 мл) (ФСБ-Т).

После отмывки ФСБ-Т планшеты блокировали 5 % обезжиренным молоком (37 °С, 1 час). После 2× промывки ФСБ-Т, планшет инкубировали с разведениями сывороток крови мышей на ФСБ (37 °С, 1 час). Трехкратно отмывтый планшет инкубировали в растворе рабочего разведения (1:1000) пероксидазного конъюгата антимышиных антител (IgG, SIGMA, США), (37 °С, 1 час). После 4× отмывки ФСБ-Т проводили окрашивание раствором тетраметилбензидином с добавлением субстратного буфера (ХимБиоТест, Россия). Реакцию останавливали после развития окраски добавлением 1М серной кислоты. Оптическую плотность регистрировали в лунках планшета при длине волны 450 нм с использованием программы WorkOut 2,5 на планшетном анализаторе VICTOR™X3 (PerkinElmer, Финляндия).

Определение цитотоксического эффекта

В 96-луночные планшеты с клеточными суспензиями добавляли по 10 мкл/лунку раствора МТТ (5 мг/мл в ФСБ). Инкубировали еще 4 часа при тех же условиях. Затем в каждую лунку планшета добавляли 100 мкл солубилизирующего раствора (10 % додецилсульфат натрия в 0,01 М соляной кислоте (HCl)) для лизиса клеток и растворения кристаллов формазана. Инкубировали при комнатной температуре 18 ч.

Для оценки интенсивности окрашивания лунок, проводили измерения оптической плотности (OD) при длине волны 595 нм на планшетном анализаторе VICTOR™X3 (PerkinElmer, Финляндия) с использованием программного обеспечения WorkOut 2,5, согласно инструкции производителя.

Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по формуле

$$(A-B/C-B) \times 100, \quad (1)$$

где А – OD лунки с клетками и исследуемым препаратом;

В – OD лунки-бланка;

С – OD лунки с клетками.

Цитометрические методы

Метод цитофлюориметрического анализа антигенов лимфоцитов

Для анализа рецепторного состава лимфоцитов, клетки помещали в цитометрические пробирки (FALCON BD) и проводили окрашивание, используя МКАТ: CD19-APC, CD3-PerCP, CD4-APC (BD Pharmingen™), CD69-FITC, CD8-PE (CALTAG™ Invitrogen), CD28 FITC (Beckman coulter), TLR-2-FITC, TLR-4-FITC (Hycult Biotech), TNF- α -PE, IFN- γ -FITC (CALTAG™ Invitrogen), IL-4-PE (Bioscience).

Для контроля неспецифического связывания Аг лимфоцитов и выделения негативного по флюорисценции лимфоцитаного гейта, использовали изотипические контроли: IgG1-FITC (BD Pharmingen™), IgG1-PE (BD Biosciences).

Пробоподготовку для цитометрического анализа проводили согласно рекомендациям производителей МКАТ. Положительным контролем были клетки, культивируемые с МА, отрицательным – клетки в среде, а так же неокрашенные клетки.

При определении внутриклеточных цитокинов использовали так же BD Cytofix/Сytoperm™ (BD Biosciences) 1 \times -раствор для фиксации и пермеабиллизации клеток, а так же 0,5 % раствор сапонины (SIGMA, США) для отмывок и пермеабиллизации фиксированных клеток.

Оценку экспрессии поверхностных и внутриклеточных рецепторов проводили с использованием проточного цитометра FACSCalibur (Becton-Dickinson, США) и программы «CellQuestPro». Установку прибора в рабочий режим и регулировку цитометра для проведения анализа образцов выполняли согласно инструкции фирмы производителя. Анализировали 10000 лейкоцитов в гейте для поверхностных Ag лимфоцитов и 30000 – для внутриклеточных.

Полученные результаты обрабатывали в программе Microsoft Excel. Данные из трех повторов усредняли и определяли стандартное отклонение с помощью t-критерия Стьюдента ($P < 0,05$). Анализировали полученные результаты опыта и контролей.

Метод цитофлуориметрического анализа жизнеспособности спленцитов мышей с красителем 7 AAD

Клетки для анализа вносили в цитометрические пробирки и окрашивали раствором, из расчета 1мкл стокового раствора 7-AAD (BD, Biosciences) в 200 мкл ФСБ /пробирка, согласно рекомендациям производителя. Контролем для установления правильного гейта служили неокрашенные клетки 7-AAD.

Установку цитометра в рабочий режим и регулировка цитометра для проведения анализа образцов выполняли согласно инструкции фирмы производителя. Цитометрический анализ проводили в красящем буфере, по FL-3-каналу флюоресценции.

Полученные результаты обрабатывали в программе Microsoft Excel. Данные из трех повторов усредняли и определяли стандартное отклонение с помощью t-критерия Стьюдента ($P < 0,05$). Анализировали полученные результаты опыта и контролей.

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 Th-1 к Th-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 ВВК32 *Borrelia afzelii* Н13 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 МП и ТМ им. Е. И. Марциновского (с.н.с., к.б.н. Васильевой И.С. и лаборантом Гальченко С.С.) по сенсibilизации мышей путем кормления на них клещей, определении критериев формирования антиклещевого иммунитета.

Рекомбинантные белки Salp15 *I. persulcatus*, DbpA и ВВК32 *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» (Оболенск, 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Иксодовые клещи – переносчики трансмиссивных заболеваний

Клещи рода *Ixodes* приурочены к различным типам ландшафта, где постоянно поддерживается высокая относительная влажность в приземном слое воздуха [4]. В основном это лесные и лесостепные зоны Северного полушария в Америке, Европе и Азии.

Иксодовые клещи являются облигатными гематофагами, которые могут паразитировать на широком круге хозяев: млекопитающих, птицах, рептилиях, амфибиях [4; 7]. Из всего разнообразия клещей особое внимание уделяется некоторым их видам, которые представляют потенциальную угрозу здоровью людей, так как являются векторами-переносчиками ряда трансмиссивных заболеваний. К их числу относятся обитающие в США *Ixodes scapularis*, в Евразии – *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus*, которые могут быть переносчиками клещевого энцефалита, клещевых боррелиозов, риккетсиозов, анаплазмозов, бабезиозов, туляремии и эрлихиозов [9; 14].

Степень инфицированности клещей и видовой состав возбудителей значительно варьирует в зависимости от стадии развития клеща, климатических условий, ландшафта и количества прокормителей. Например, в Восточной и Южной Европе количество имаго *Ixodes ricinus*, инфицированных боррелиями колеблется в пределах от 3 до 75 %, нимф – от 2 до 43 % и личинок – от 0 до 11 %. Для взрослых особей клещей вида *I. persulcatus* природная инфицированность колеблется от 1 до 60 %, у нимф и личинок значения ниже (10-30 %) [5].

Заражение клещей происходит при питании на инфицированных резервуарных хозяевах. Далее возбудитель передается по циклу развития от личинок к нимфам и от нимф к имаго. Передача патогенов позвоночным клещами осуществляется трансмиссивно при присасывании инфицированных личинок,

нимф и самок. В циркуляции возбудителя в природном очаге могут участвовать несколько видов клещей и позвоночных.

1.2. Особенности функционирования слюнных желез иксодовых клещей

Исследования микроанатомического строения, клеточного состава, характера и особенностей секреции подтверждают сложную секреторную активность слюнных желез, указывают на согласованность и синхронизацию морфофункциональных изменений в организме питающихся самок иксодовых клещей [8]. Это отражается в сложности взаимоотношений клеща и позвоночного-хозяина [1] при поэтапном сдерживании защитных механизмов хозяина-прокормителя.

За период многодневного питания в организм хозяина вводится не менее нескольких десятков микролитров слюны, что несравнимо больше, чем во время питания кровососущих двукрылых. Отсюда становится понятным причины интоксикации организма хозяина, так как вместе со слюной паразита в его организм вводится не только большое количество чужеродного белка, но и различные токсины и биологически активные вещества [4].

Слюнные железы клещей выполняют ряд важных функций, как во время паразитирования, так и в свободноживущий период. К ним относятся: прикрепление к месту питания посредством секреции цемента, модулирование иммунного ответа хозяина, выделение токсинов, осморегуляция, выделение гигроскопического раствора, который скапливается в ротовой полости и абсорбирует атмосферную воду (обеспечение влагой во время, когда клещ не паразитирует), участие в процессе размножения [66]. Все это возможно благодаря многокомпонентному составу слюны.

Известно, что слюна иксодовых клещей содержит сотни различных биологически активных веществ, которые выделяются на разных этапах кровососания [1; 4; 91]. Большинство белков, обладающих иммунорегулирующим

действием, накапливается в слюнных альвеолах 2 типа на 3 сутки питания, достигая максимального содержания к 5 суткам питания [7].

При изучении слюнных желез самок таежного клеща *I. persulcatus* в период голодания и на различных этапах питания, установили, что заполнение клеток секреторными гранулами начинается еще до прикрепления клеща [1].

1.3. Морфологические изменения в месте питания клещей

Биологически активные компоненты слюны регулируют взаимодействие клеща с организмом хозяина и модулируют иммунный ответ прокормителя [61; 100; 176; 204]. В первую очередь они предотвращают отторжение присосавшегося паразита, подавляя пролиферацию эпидермиса вокруг места прикрепления, и обеспечивают его нормальное питание, регулируя развитие очага воспаления и появление геморрагии.

Воспалительный очаг создается с момента прикрепления клеща. У дистальных концов хелицер могут формироваться небольшие гематомы, из которых клещ получает первые порции пищи в виде лимфы и продуктов лизиса тканей. Капилляры заполняются первоначально нейтрофилами и в меньшей степени лимфоцитами. В зоне инфильтрации нейтрофилов происходит расширение дермы и формируется пищевая полость, из которой клещ высасывает ее содержимое. Содержимое пищевой полости меняется в зависимости от фазы питания и особенностей воспалительной реакции хозяина. Размеры пищевой полости в процессе питания увеличиваются. В конце питания, благодаря увеличению проницаемости и разрушению стенок окружающих капилляров и кровеносных сосудов, пищевая полость заполняется цельной кровью и фактически превращается в обширную гематому. Характер кожных реакций хозяев может меняться в зависимости от видовой принадлежности [4]. Реакция врожденного и формирование адаптивного иммунитета в ответ на питание клещей зависит как от вида клещей, так и от вида хозяина [61].

1.4. Влияние компонентов слюны клещей на развитие иммунных реакций хозяина

У большинства организмов существует целый комплекс механизмов, защищающих от присасывания эктопаразитов (гемостаз, воспаление, клеточный и гуморальный иммунитет). Все они начинают действовать с момента прикрепления и начала насыщения гематофагов. Адаптивными приспособлениями к успешному осуществлению полноценного питания клещей является ряд биологически активных компонентов их слюны. [4; 61; 66; 91; 115].

Для твердотельных клещей, к которым относится подсемейство *Ixodinae*, возможное количество секретируемых протеинов находится в пределах 500. Сколько из них фактически присутствует в значимом количестве в слюнных железах еще не оценено [163]. По своему составу многие из открытых протеинов не имеют аналогов среди белков, находящихся в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Большинство белков слюны являются членами мульти-генных семейств. Некоторые протеины из этих семейств экспрессируются на разных фазах питания клеща [91]. Изменения белкового спектра слюны, кроме обеспечения нормального питания клеща способствует его защите от иммунной системы хозяина.

Так, свертыванию крови препятствуют апираза, которая гидролизует АДФ и АТФ в АМФ и ортофосфат [125; 136; 137; 164]. Простаглицлин и дисинтегрин блокируют связывание фибриногена с тромбоцитами [166; 167; 201]. Металлопротеазы, ингибиторы протеаз (*Ixolaris* [92; 144]; *Salp9*, *Salp14* [146]) и ингибиторы протеазо-активирующихся рецепторов (PAR) [91] обладают фибринолитическим и противосвертывающим действием [89]. Слюна клещей обладает анти-ангиогенными свойствами [90; 94], а так же модулирует экспрессию рецепторов адгезии, например Р-селектина [138]. В состав слюны

входят простагландины PGE_2 и $PGF_{2\alpha}$, обладающие сосудорасширяющими свойствами [74; 112; 165] и ингибирующие агрегацию тромбоцитов [125].

Болевые ощущения вызываются выделением из тромбоцитов, базофилов и тучных клеток серотонина, гистамина, из поврежденных клеток – АТФ, высвобождение брадикинина [82; 123; 157], IL-1 из нейтрофилов [91]. Слюна клещей содержит специфические ферменты, действующие на АТФ [136; 164; 166], липокалины, разрушающие серотонин и гистамин [154; 173], пептидазы, высокоспецифичные к брадикинину [168; 169].

Способность иммунной системы распознавать и отвечать на проникновение чужеродного Аг и повреждение им тканей хозяина зависит от продукции некоторых медиаторов, в том числе образующихся при активации системы комплемента, а так же цитокинов.

В слюне клещей обнаружены белки, влияющие на систему комплемента [115; 163]. OMCI [148; 172] взаимодействует с C5 конвертазой, ингибирует активацию C5; Isac [192], Salp20 [190], IRAC I и II [179] регулируют активацию комплемента, взаимодействуя с C3 конвертазой. Липокалин, взаимодействуя с C5 конвертазой, нарушает классический и альтернативный пути комплемента [148].

Секреция цитокинов – первая реакция системы врожденного иммунитета на поступление патогенов [20; 27]. Благодаря действию цитокинов происходит привлечение в очаг воспаления других иммунокомпетентных клеток, без прямого контакта с Аг. Различные протеины слюны, например, Iris [133], IL-2-связывающий протеин [99], Salp15 [115, 40, 97], могут связывать и ингибировать некоторые цитокины [93; 99; 106; 128; 196; 203]. Так же, было показано, что слюна клещей *I. scapularis* уменьшает образование IL-2 и IFN- γ , но увеличивает синтез IL-4 и IL-10 [175; 222], что свидетельствует о поляризации адаптивного иммунного ответа в сторону Th-2 [81]. В слюне некоторых видов клещей обнаружены молекулы, действующие против хемокинов человека CXCL8,

CCL2, CCL3, CCL5, CCL11 [195], а так же связывающиеся с ростовыми факторами TGF- β 1, PDGF, FGF-2, HGF [107].

Активация клеточного звена иммунной системы осуществляется двумя типами рецепторов:

1. Паттернраспознающие рецепторы. Они распознают типовые, консервативные в структурном отношении молекулы (патогенассоциированные молекулярные паттерны – ПАМП), характерные для определенных групп микроорганизмов. К числу таких рецепторов относятся «Toll-подобные рецепторы» (TLR) [27; 12]. В результате взаимодействия лигандов с этими рецепторами происходит повышение синтеза провоспалительных цитокинов, последующее развитие воспаления и активация врожденного иммунитета. Рецепторы характерны не только для фагоцитов, но и для эпителиальных клеток слизистых, эндотелиальных клеток [12; 27; 28].

2. Рецепторы распознающие Аг. Они представлены только на Т- и В-лимфоцитах. Большое разнообразие и потенциальное количество их вариантов обусловлено генами, формирующимися в результате генетических рекомбинаций при антигеннезависимой дифференцировке Т- и В-клеток [20; 27].

Взаимодействие клещевых Аг с клетками врожденного иммунитета эпидермиса и дермы (дендритные клетки, макрофаги, эозинофилы, тучные клетки, кератиноциты) запускает реакции первой линии защиты. Эти клетки продуцируют хемоаттрактанты, привлекающие дополнительно другие клетки (нейтрофилы) к месту прикрепления клеща.

Макрофаги являются ключевыми клетками врожденного и адаптивного звеньев иммунитета, обеспечивая их взаимосвязь. Они способны индуцировать гуморальный иммунный ответ и цитотоксические реакции лимфоцитов [20; 28]. Макрофаги могут презентировать слюнные Аг лимфоцитам подобно дендритным клеткам, продуцировать цитокины и хемокины, привлекающие клетки, которые обеспечивают процесс воспаления. В месте образовавшейся полости при питании клеща количество макрофагов увеличивается незначительно, в отличие от

прилегающих тканей [63; 64]. Продукция макрофагами провоспалительных цитокинов IL-1 и TNF- α в присутствии экстракта слюнных желез различных видов клещей снижается [105; 160].

Слюна клещей оказывает влияние на некоторые функции дендритных клеток, например их созревание и хемотаксис [69; 118; 151; 152; 174], продукцию цитокинов IL-12 и TNF- α [69; 174].

Миелоидные дендритные клетки, подобно макрофагам, поглощают Аг и транспортируют их в региональные лимфатические узлы. По мере перемещения клеток происходит процессинг Аг, образование комплекса фрагментов антигенного материала с МНС I или II классов и экспрессия их на поверхностную мембрану. В таком виде Аг распознается Т-лимфоцитами [20; 27]. В условиях *in vitro* антиген-презентация слюнных Аг клетками Лангерганса (популяция дендритных клеток кожи) приводила к пролиферации Т-лимфоцитов морских свинок, сенсibilизированных укусами клещей [147].

В лимфатических узлах дендритные клетки взаимодействуют с клонами Т-лимфоцитов, которые распознают комплексы антигенных пептидов с МНС. После распознавания лиганда наивные Т-хелперы (Тх) начинают дифференцироваться в субпопуляции зрелых Тх1-, Тх-2, Тх-9, Тх-17, Тфх-лимфоцитов. Каждый из этих типов клеток обладает своими эффекторными характеристиками [27].

У *I. scapularis* среди компонентов слюны выделяют белок с молекулярной массой 15 кДа (Salp15), который ингибирует активацию Т-клеток [40; 97; 99; 130; 133]. Он специфически связывается с CD4 рецептором Т-хелперов, и в результате ингибирует рецептор-опосредованную передачу сигнала в клетку, приводя к снижению продукции IL-2 и уменьшению пролиферации Т-лимфоцитов [97; 124]. Кроме того существует IL-2-связывающий протеин слюны клещей, который также ингибирует пролиферацию хелперов и ЦТЛ [99].

В-лимфоциты, клетки адаптивной иммунной системы, являются предшественниками плазматических клеток, продуцирующих Ат. Они не только

обеспечивают гуморальный иммунный ответ, но так же выполняют регуляторные функции. В-клеточный рецептор – мембранная форма иммуноглобулина – связывает нативный Аг. Таким образом, В-лимфоциты могут выполнять антигенпрезентирующие функции [28].

Антительный ответ является значительным иммунным эффекторным механизмом против клещей [109]. Значение Аг в клещевой резистентности было продемонстрировано в экспериментах при введении животным иммунной сыворотки [44; 58; 62; 205]. Одним из компонентов слюны клещей является IgG-связывающий протеин [200]. Наличие в слюне *I. ricinus* В-клеточного ингибирующего протеина (VIP) супрессирует пролиферацию мышинных В-клеток, стимулированную LPS [108; 219].

1.5. Специфическая противоклещевая резистентность

В случае повторных присасываний клеща могут развиваться антиклещевые иммунные реакции [202; 208]. В результате такой резистентности наблюдается уменьшение веса напитавшихся клещей и их количества, уменьшение количества и жизнеспособности яиц, нарушение процессов линьки личинок и нимф и гибель насытившихся клещей [53; 202].

Впервые это явление было описано Трегером [188]. К настоящему времени приобретение резистентности к присасыванию клещей при повторных кормлениях описано у разных видов лабораторных и сельскохозяйственных животных, а изучению механизмов приобретенного клещевого иммунитета уделяется большое внимание [60; 202; 208; 213].

Антиклещевой иммунитет начинает индуцироваться после прикрепления клещей в форме реакций кожной гиперчувствительности немедленного типа и замедленного типа. В результате ротовые органы прикрепившегося клеща могут быть изолированными от притока крови сгустком базофилов и сетью коллагеновых волокон, и питание становится невозможным. Решающую роль в развитии этого

процесса играет гистамин и, возможно, другие вазоактивные амины. В местах прикрепления паразитов так же не развиваются необходимые для нормального насыщения геморрагии. Вместо них наблюдаются гнойно-некротические процессы с образованием в дерме обширных полостей с жидким содержимым. Нормальное питание клещей становится затруднительным, и они отторгаются вместе с поврежденными участками кожи [4].

Активированная система комплемента в месте укуса клеща может генерировать медиаторы воспаления, хемотаксиса, опсонинов, привлекать базофилы и другие клетки, связанные с резистентностью хозяина. В результате активации тучных клеток и базофилов в месте укуса происходит высвобождение из них биоактивных молекул, включая гистамин, лейкотриены, простагландины и энзимы [57; 59; 202].

Попавшие в организм хозяина клещевые Аг контактируют с паттернраспознающими рецепторами макрофагов, что сопровождается активацией провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , TNF- β). Секреция цитокинов стимулирует приток нейтрофилов, затем моноцитов, эпителиальных, эндотелиальных, дендритных клеток, которые организуют первую линию защиты.

Если первая линия защиты не обеспечивает удаление антигенного материала, то начинает развиваться адаптивный иммунный ответ. Ключевую роль в развитии этого процесса играют антиген-презентирующие клетки [79]. Активация Т-, а затем В- лимфоцитов приводит в дальнейшем к образованию специфических Ат, большая часть которых относится к классу IgG и IgE [216].

Ат, поступающие в кишечник клеща вместе с пищей, повреждают клетки эпителия кишки [33; 126], проникают в гемолимфу [32; 51; 187], что было обнаружено у самок клещей, питавшихся на сенсibilизированных морских свинках [197].

У устойчивых к клещам животных обнаружена прямая связь между титрами Ат в крови и уровнем резистентности. Напряженность противоклещевого

иммунитета положительно коррелирует и с интенсивностью кожной реакции на клещевые Аг [4].

Следует отметить, что лишь некоторые клещевые Аг стимулируют формирование защитных Ат [4].

Наряду с защитным действием Ат [16; 36; 56; 58; 171] большое значение имеет лимфоцитарное звено иммунитета. В опытах с трансфузией иммунных лимфоцитов морских свинок была доказана большая устойчивость к *D. andersoni* и *I. ricinus*, чем при переливании одной только сыворотки крови [16; 101; 102; 202]. Так же в экспериментах *in vitro* [96; 177; 206] при культивировании лимфоцитов от животных, сенсibilизированных питанием на них клещей, в присутствии экстракта слюнных желез происходил бластогенез клеток, а стимулированные Кона лимфоциты продуцировали значительное количество TNF- α и GM-CSF [95]. Максимальные значения определяли у клеток, полученных в течение повторных экспозиций.

1.6. Другие факторы, влияющие на противоклещевой иммунитет

Приобретенная противоклещевая резистентность в большинстве случаев не исключает возможности повторного питания клещей и препятствует развитию на хозяине лишь части напавших на него паразитов [4]. Значительно влияние могут оказывать как факторы внешней среды, например, климатические колебания, так и физиологическое состояние, возраст, пол животных. Степень приобретенной резистентности может быть различной у разных видов хозяев [7]. Поэтому во многих случаях трудно вычленить воздействие на питание и последующее развитие клещей собственно иммунных механизмов от не связанных с ним факторов окружающей среды и организма хозяина [4]. Специфичность противоклещевого иммунитета у разных хозяев отмечается многими исследователями [38; 72; 121; 139; 141; 162].

Отсутствие полной резистентности в природе объясняется так же случайным распределением паразитарной нагрузки между особями популяции прокормителя., т.е. животные контактируют с разным количеством питающихся клещей (разная иммунизирующая доза) [7]. Средняя паразитарная нагрузка на отдельно взятую особь-хозяина не значительна. В результате, развитие резистентности не исключает возможности повторного присасывания к тем же животным, а паразитирования клещей в большинстве случаев не ведет к гибели хозяев [3].

Приобретенная противоклещевая резистентность может быть важным фактором регуляции обилия паразитов и может непосредственно воздействовать на эффективность получения и передачи патогенов позвоночным во время питания [16; 77].

1.7. Перспективы создания анитклещевых вакцин

Изучение иммунных реакций хозяина на клещевые Аг (местные кожные реакции, действие врожденной и адаптивной иммунной системы), препятствующих питанию клещей и передаче ими патогенов подводит научное обоснование для разработки антиклещевых вакцин. Возможность создания таких вакцин подтверждается существованием естественного антиклещевого иммунитета у ряда млекопитающих [48; 85; 111; 202] и у людей, проживающих в эндемичных по клещевым трансмиссивным заболеваниям районах [65]. Такие вакцины могут стать альтернативой существующим методам контроля численности клещей и уменьшить риск заражения патогенами, передаваемыми при питании паразитов [182; 212].

Однако для создания эффективных вакцин необходимо преодолеть ряд трудностей. Прежде всего – это поиск и выбор подходящего антигена-мишени. Выделяют две группы клещевых Аг: внешние и внутренние [9; 149]. К первым относятся компоненты слюны. Отмечено, что наибольшее содержание различных

Аг в слюне определяется в начале питания, тогда как на поздних сроках выделение некоторых Аг прекращается [47]. Внешние Аг процессируются дендритными клетками хозяина и презентуются Т-лимфоцитам, запуская клеточный иммунный ответ [37; 147; 132].

Внутренние клещевые Аг непосредственно не контактируют с иммунной системой хозяина. Тем не менее, они могут иметь большое значение в иммунной защите. К таким Аг относятся компоненты клеток средней кишки клещей [33; 214]. Вакцинация внутренними Аг индуцирует гуморальный иммунный ответ у прокормителя. Попавшие в этом случае Ат взаимодействуют с Аг средней кишки клеща, повреждая ее, что приводит к последующей гибели паразита [189]. Внутренние клещевые Аг не индуцируют иммунный ответ при прикреплении и в начале питания клеща.

Изучение антиклещевого иммунитета является основой для подбора клещевых Аг, которые будут не только препятствовать процессу длительного питания эктопаразитов, но и одновременно предотвращать трансмиссию патогенных микроорганизмов, передаваемых клещами в процессе их питания [149]. Экспериментально доказано, что у животных, сенсibilизированных повторными напусками на них клещей, повышается резистентность к трансмиссивным инфекциям при укусе клеща [49; 84; 88; 122; 142; 207].

Таким образом, при формировании антиклещевого иммунитета решаются две проблемы: уменьшение клещевой нагрузки и предупреждение передачи патогенов хозяину [54]. В качестве источника протективных Аг [210] могут быть рассмотрены рекомбинантные белки. Однако существуют трудности в их получении, связанные с формированием дисульфидной связи и гликозилированием [185; 209; 220]. Недостатком при использовании единичного рекомбинантного Аг является его меньшая эффективность по сравнению с использованием комплекса частично-очищенных Аг [211]. Очевидно, что для конструирования антиклещевой вакцины следует включать в ее состав несколько Аг как внешних, так и внутренних [212].

В процессе жизненного цикла клещи рода *Ixodes* меняют прокормителей, причем происходит изменение компонентного состава клещевых Аг [4; 91]. Это затрудняет создание эффективной вакцины. Тем не менее, поиски протективных Аг продолжаются. К настоящему времени идентифицировано большое количество иммуногенных молекул из иксодовых клещей [61; 71; 114; 115; 193]. Особое внимание исследователей привлекают различные белки слюны клещей (Salps) [9; 91; 114; 117; 193]. Эффективность антиклещевой вакцины с длительным протективным действием, вероятно, будет определяться индукцией гуморального и клеточного иммунитета за счет кооперативной работы нескольких Аг [9]. Дополнение препаратов специфическими Аг патогенов, возможно улучшит протективное действие вакцин в защите хозяина от заболеваний, передаваемых во время питания клещей [9].

Можно предположить, что «идеальные» противоклещевые вакцины должны соответствовать следующим характеристикам: обеспечивать протективное действие против множества видов клещей и всех стадий развития (личинки, нимфы, имаго, продукция яиц), формировать напряженный иммунитет, предотвращать передачу патогенов клещами, быть дешевыми в производстве Аг [149].

1.8. Особенности взаимодействий клещ-возбудитель-хозяин

1.8.1. Адаптации возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов в организме клеща

Для выживания и развития в клеще патогенный микроб должен приспособить свой метаболизм к специфической внутренней среде организма переносчика, например, к колебаниям температуры и меньшей осмотической стабильности. Просвет средней кишки мало пригоден для жизнедеятельности

большинства возбудителей, поэтому они проникают в клетки стенок кишечника и полость тела, занимая определенные органы и ткани [4].

Для *Borrelia burgdorferi* s. lato характерно обитание на поверхности кишечных клеток и в межклеточных пространствах за счет рецепторных взаимодействий поверхностного протеина бактерий OspA с TROSPA-рецепторами (Tick Receptor for OspA). Установлено, что в присутствии боррелий количество TROSPA возрастает, что подтверждает адаптивные приспособления *Borrelia burgdorferi* и их влияние на транскрипцию некоторых генов клещей [117].

Во время питания клеща количество боррелий увеличивается, и они перемещаются с поверхности кишечных клеток по межклеточным пространствам и через цитоплазму клеток в гемолимфу. Далее боррелии проникают в слюнные железы, мальпигиевы сосуды, гонады и другие внутренние органы [4; 7]. У *I. persulcatus* было обнаружено, что боррелии в небольших концентрациях локализуются в слюнных железах еще голодных клещей и, следовательно, существует вероятность передачи возбудителя со слюной уже в первые часы после прикрепления [7; 22].

1.8.2. Адаптации возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов в организме теплокровного хозяина

Возбудитель, поступивший вместе со слюной клеща в организм теплокровного хозяина, сталкивается с новой, более сложной средой обитания. В месте присасывания клеща образуется инфильтрат, куда первоначально привлекается большое количество клеточных и гуморальных элементов врожденной иммунной системы, а также компонентов образующихся в результате лизиса стенок кровеносных сосудов и соединительнотканых элементов дермы.

Биологически активные вещества клещей, оказывающие подавляющее действие на иммунную защиту организма хозяина облегчают процессы размножения и диссеминации проникших патогенов [61; 89; 115; 176].

Начиная с первого дня питания клеща кровью происходит смена спектра поверхностных Ag боррелий. Уровень экспрессии доминирующего поверхностного протеина боррелий OspA резко падает, а доля боррелий экспрессирующих OspC, наоборот, возрастает [150]. На переключение экспрессии генов поверхностных протеинов OspA и OspC оказывают влияние многие факторы: температура [181], изменение pH и содержимого кишечника [73; 67; 217].

Изменение спектра поверхностных Ag боррелий снижает, по-видимому, эффективность иммунологического контроля. В экспериментах *in vitro* было показано, что OspA индуцирует продукцию ряда веществ, вызывающих местную реакцию воспаления (IL-1, IL-6, TNF- α , оксида азота и супероксид-радикалов) [98], но стимулируют синтез IL-10 [76; 98]. Таким образом, уменьшение спирохетой экспрессии гена *osp A* может ингибировать иммунный ответ по Th-1 типу и избегать ее гибели.

Установлено так же, что экспрессия *B. burgdorferi* OspC стимулирует хемотаксис боррелий из кишечника через гемолимфу в слюнные железы. В слюнных железах, благодаря OspC, на поверхности боррелии адсорбируются белки слюны, которые экранируют патоген от иммунных механизмов хозяина во время проникновения в его кожные покровы и на первых этапах размножения [161].

К адаптивным приспособлениям боррелий для успешной диссеминации в организме теплокровного хозяина так же можно отнести их иммуномодулирующее действие за счет способности OspE и OspE-подобных протеинов связывать фактор H и ингибировать каскад комплемента [39].

Указанные выше и многие другие дифференциально экспрессирующиеся Ag, (для них установлено не менее 150 генов), обеспечивают выживание боррелий в двух различных по условиям среды хозяевах: клеще и млекопитающем [155; 183]. К их числу относятся, например, следующие иммунодоминантные Ag боррелий, которые так же имеют большое значение в диагностике:

DbpA – протеин (18 кДа) *B. burgdorferi sensu lato* [110; 119] связывается с декарином – коллаген-ассоциированным протеогликаном тканей хозяина. Подобно другим протеинам установлена значительная разница в его аминокислотной последовательности для разных видов *B. burgdorferi sensu lato* (гетерогенность до 40 %) [181]. Определены 83 аллеля *dbpA* гена [180].

VlsE – поверхностный липопротеин (около 34-35 kDa), содержит вариабильные и инвариабильные домены [80; 221]. Постоянные изменения в аминокислотной последовательности VlsE позволяют боррелии спастись от надзора адаптивного иммунитета хозяина, что является необходимым условием для персистенции инфекции [70; 78; 135].

Различные участки гена *vlsE* экспрессируются на разных стадиях развития ИКБ. Одна из областей VlsE (IR6) – высоко иммуногенна [134] и консервативна для многих видов *B. burgdorferi sensu lato*, что делает ее привлекательным кандидатом в качестве иммунодоминантного Аг в исследованиях.

ВВК32 – фибронектин связывающий высокоспецифичный Аг (около 47 кДа). С его помощью спирохета может прикрепляться к внеклеточному матриксу [104; 159]. ВВК32 экспрессируется *B. burgdorferi sensu lato* в клеще во время питания его кровью, а так же на ранней стадии развития заболевания [83].

Таким образом, основные свойства боррелий, обеспечивающие их персистенцию, это собственная антигенная изменчивость [21, 120] и способность использовать в качестве защитного экрана Аг слюны переносчика.

1.9. *Borrelia burgdorferi* и развитие инфекционного процесса

Возбудителями ИКБ являются спирохеты *Borrelia burgdorferi* – граммотрицательные бактерии, которые относятся к порядку *Spirochaetales*, семейству *Spirochaetaceae*, роду *Borrelia*. В настоящее время в группе *B. burgdorferi sensu lato* выделяют 18 видов (геновидов). Главными патогенными видами для человека и животных считаются 3 вида: *Borrelia burgdorferi sensu*

stricto (s.s), *B. afzelii* и *B. garinii*. Все эти боррелии встречаются в Европе и Азии. В Северной Америке обнаружена только *Borrelia burgdorferi* s.s. [45]. Есть данные о том, что этиологическим агентом ИКБ, вероятно, являются виды *B. bissettii* sp.nov., *B. valaisiana*, *B. bavariensis* и *B. spielmanii* [156; 199]. На территории Российской Федерации циркулируют, главным образом, *B. afzelii* и *B. garinii* [13].

Считается, что генотипические и антигенные отличия разных видов боррелий определяют особенности патогенеза и клинического проявления заболевания: *B. garinii* – нейроборрелиоз, *B. burgdorferi sensu stricto* – Лайм-артриты, *B. afzelii* – хронические атрофические дерматиты [43; 194].

В развитии ИКБ определяют 3 стадии: 1 стадия – локальной инфекции (возбудитель попадает в кожу после присасывания клеща); 2 стадия – диссеминации боррелий в различные органы (характеризуется широким спектром клинических проявлений); 3 стадия – персистенция инфекции в каком-либо органе или ткани (поражение какого-либо одного органа или системы) [21].

Первоначально против патогенов, проникших в ткань, начинает действовать врожденный иммунитет, главным компонентом которого являются фагоциты (макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы). Эти клетки несут на своей поверхности рецепторы, распознающие и связывающие спирохеты: интегрин CR3 [184] и Fc-рецепторы [50], CD14 рецепторы макрофагов, маннозные рецепторы, CD1-рецепторы дендритных клеток, TLR. TLR-2 – главные сигнальные рецепторы в распознавании боррелиозных Аг [55; 113; 143; 191]. Макрофаги и дендритные клетки распознают Omps посредством гетеродимеров, образующихся в результате взаимодействия TLR-2 и TLR-1 или TLR-6. Эти TLR играют важную роль в контроле при различной степени зараженности спирохетами, но не являются необходимыми при увеличении продукции Аг [75].

Поглощенный антиген в фагоцитах подвергается процессингу: лизосомальная [145] и нелизосомальная [170] деградация боррелий, индукция окислительного взрыва, мобилизация кальция.

Активированные фагоциты начинают увеличивать экспрессию ко-стимуляторных молекул, в том числе CD80 и CD86, секрецию цитокинов с провоспалительным (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) и иммуностимулирующим (IL-1, IL-3, IL-6, IL-12, IL-15, TNF- α) действием [21]. Цитокины оказывают воздействие на кровоток, увеличивают количество молекул адгезии на эндотелиальных клетках (способствует миграции лейкоцитов к пораженному участку), активируют натуральные киллеры (НК) к уничтожению пораженных клеток. Увеличение ко-стимуляторных рецепторов необходимо для развития адаптивного иммунного ответа [20; 25; 28].

Направление иммунного ответа определяется формированием к конкретному Аг специфического клона Т- и В-лимфоцитов, пролиферация и дифференцировка которого зависит от цитокинового профиля [17].

При развитии заболевания прослеживается неустойчивость соотношения Тх-1 и Тх-2, то есть смешанный Тх-1/Тх-2 профиль иммунной защиты [11; 75]. Тем не менее, благоприятный прогноз ИКБ определяется Т-хелперами 1 типа, с более поздним переключением на активацию Т-хелперов 2 типа. Хотя до настоящего времени нет однозначного мнения о направленности цитокинового ответа, слабый Тх-1-ответ может свидетельствовать о пролонгировании заболевания [6].

Диссеминация боррелий из первичного очага в другие участки кожи и внутренние органы происходит, главным образом, лимфогенно и гематогенно. Кроме того, боррелии могут распространяться посредством прямой пенетрации через эндотелиальные клетки в просвет сосудов, а так же периневрально [21].

При диссеминации бактерий происходит значительная активация иммунной системы, что приводит как к генерализованному, так и местному гуморальному и клеточному иммунному ответу [21].

Клеточный иммунный ответ формируется по мере прогрессирования заболевания, при этом наибольшая реактивность моноклеарных клеток регистрируется в тканях-"мишенях". Повышается уровень Т-хелперов и

T-супрессоров, индекс стимуляции лимфоцитов крови. Установлено, что степень изменения клеточного звена иммунной системы зависит от тяжести течения заболевания.

Индукцированная боррелиями продукция Ат сама по себе не достаточна для устранения патогена, так же как и один Тх-1 цитокиновый ответ не способен защитить против персистирующей инфекции. Следовательно, для эффективной защиты от ИКБ необходимо участие как гуморального, так и клеточного иммунного ответа [218].

При отсутствии или недостаточном лечении расширяется спектр антител к антигенам с молекулярной массой от 16 до 93 кД. Повышается так же количество циркулирующих в крови иммунных комплексов [21].

При незавершенном фагоцитозе и неадекватном гуморальном ответе создаются условия для хронизации инфекционного процесса и персистенции боррелий [19].

Таким образом, из выше изложенного, следует:

1. Причина хронизации инфекции определяется недостаточно сформированным специфическим иммунным ответом и индукцией аутоантител к собственным тканям.

2. Персистенция боррелий возможна благодаря их значительной резистентности к воздействию системы комплемента, антигенной изменчивости [21], иммуномодулирующему действию слюны клеща.

1.10. Использование иммунологических методов в исследованиях иммунопатогенеза иксодовых клещевых боррелиозов

Как уже было отмечено, в иммунопатогенезе ИКБ значительную роль играют как гуморальный, так и клеточный иммунитет. В связи с этим, исследование уровня иммуноглобулинов, а также функционального состояния лимфоцитарного звена иммунной системы представляется очевидным.

Для этих целей наиболее оптимальными являются серологические (прежде всего ИФА) и цитометрические методы. Они широко используются как в медицинских, так и научных целях.

Метод иммуноферментного анализа

В основе ИФА лежит реакция взаимодействия Аг-Ат. Несмотря на большое количество различных вариантов проведения ИФА, все они позволяют провести количественные измерения и характеризуются достаточно высокой специфичностью и чувствительностью [10].

Цитометрические методы

Центральное место в иммунных реакциях организма принадлежит лимфоцитам. Лимфоциты представляют собой неоднородную популяцию, различающуюся по генетическим и функциональным особенностям. По мере развития иммунного процесса на поверхности лимфоцитов происходит изменение в экспрессии различных рецепторов, появление которых обусловлено процессами активации, пролиферации, апоптоза клеток.

Выявление различных субпопуляций можно провести по характерным для них мембранным маркерам, согласно Системе маркерных антигенов (CD) [18; 25]. Так, например, Т-, В-лимфоциты, Т-х, ЦТЛ определяют как CD3+, CD19+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ клетки, соответственно, а Тх-1 и Тх-2 – по синтезируемым ими внутриклеточным цитокинам IFN- γ , IL-4, то есть как CD3+CD4+IFN- γ + и CD3+CD4+IL-4+ субпопуляции.

Оценку функционального состояния лимфоцитов можно проводить, используя специфическую активацию ИКК антигенами *in vitro*, с последующей регистрацией клеточных рецепторов при помощи цитометрического анализа. Лазерная проточная цитометрия имеет большое преимущество среди других методов. С ее помощью можно, во-первых, провести более углубленные исследования количественной и функциональной характеристики ИКК, во-вторых, метод позволяет анализировать большое количество событий [26].

В качестве критериев при функциональных изменениях в клетках целесообразно использовать маркеры активации лимфоцитов, например CD69, а так же ко-стимуляторные рецепторы CD28, TLR-2, TLR-4, и внутриклеточные цитокины TNF- α , IFN- γ , IL-4 у Т-клеток.

1.11. Диагностика иксодовых клещевых боррелиозов

Согласно анализу статистических данных по заболеваемости инфекциями, передающимися клещами на территории РФ по числу случаев лидирует ИКБ. По сравнению, например с клещевым энцефалитом, случаев ИКБ ежегодно бывает больше в 2-3 раза [15]. Недооценка опасности боррелиоза в инфекционной патологии обусловлена относительно легким течением ИКБ в остром периоде заболевания и отсутствием летальных исходов [15].

Результаты лечения ИКБ сильно зависят от момента начала этиотропной терапии, что характеризует важность правильного дифференциального диагноза на ранней стадии заболевания [24]. В связи с наличием определенных трудностей клинической диагностики клещевых инфекций возникает необходимость совершенствования их лабораторной верификации, особенно на ранних стадиях инфекционного процесса. Практически все используемые методы лабораторной диагностики ИКБ малоэффективны в первые недели заболевания. Но и в периоде разгара болезни частота лабораторного подтверждения диагноза редко превышает 50-70 %. Следовательно, актуальность поиска путей для повышения чувствительности и специфичности методов очевидна [24].

Достоверным признаком ИКБ является проявление мигрирующей эритемы (МЭ) в месте укуса клеща. У безэритемных больных (20-45 % случаев) диагностика по клиническим признакам затруднительна.

Микробиологические методы идентификации (как «золотой стандарт» в исследованиях) не всегда результативны и сложны. Боррелии очень требовательны к условиям культивирования. Уровень выявления заболевания из

первичной МЭ в среднем составляет 68 %, из крови – 40 %, из цереброспинальной жидкости – 14 % [35].

Обнаружение ДНК возбудителя с помощью ПЦР достигает почти 100 % только при анализе материала из МЭ [2]. Что касается исследований крови, ликвора и мочи, то здесь чувствительность ПЦР низкая [24].

Серологические методы на сегодняшний день являются самыми распространенными, а их чувствительность и специфичность составляет в среднем 70-90 % [24]. Тем не менее, в серологических исследованиях титров специфических Ат существуют моменты, снижающих эффективность этого метода диагностики. Например, диагностически значимый уровень специфических IgM в первую неделю от появления МЭ выявляется только у 13 % больных [34]. Выявление специфических IgG возможно только к концу первого месяца болезни, а частота их детекции находится в пределах от 8,3-52 % [86]. Следует отметить, что при серологических исследованиях наблюдаются как ложнопозитивные, ложнонегативные и сомнительные результаты [31].

Для повышения надежности и достоверности результатов диагностики используют двух этапную схему исследований сыворотки больных: первый этап – ИФА (иммуноферментный анализ) или НРИФ (непрямая реакция иммунофлюоресценции); второй этап – иммуноблот, положительных или сомнительных образцов.

Следует подчеркнуть проблему отсутствия стандартизированного Ag и в нашей стране и за рубежом. Особенно это важно там, где циркулирует несколько геновидов боррелий. Антигенные спектры боррелий даже близко расположенных географических зон могут существенно различаться, поэтому тест-системы, разработанные в одних странах, часто не пригодны для использования в других регионах. Зачастую стёртые и безэритемные формы болезни, хронические и поздние проявления инфекции, а также рецидивы заболевания, протекающие в виде неспецифических синдромов остаются в стороне от внимания инфекционистов и не подвергаются диагностике.

1.11.1. Актуальность разработки иммунодиагностического клеточного теста

При развитии инфекционного заболевания сенсibilизация Т-клеток может быть выявлена раньше и точнее, чем продукция специфических Аг. По литературным данным в ходе развития ИКБ наблюдается изменение соотношений различных субпопуляций лимфоцитов [21; 24; 25]. Следовательно, изучение Т-клеточного иммунного ответа на конкретные Аг боррелий может стать основой в разработке новых иммунодиагностических тестов, подобных LTT-MELISA [191].

Принцип для разработки подобного диагностического клеточного теста основывается на специфическом взаимодействии Аг с лимфоцитами *in vitro*. Активация и пролиферация лимфоцитов *in vitro* в ответ на обработку их митогенами или Аг может быть определена по увеличению экспрессии ко-стимуляторных рецепторов: CD 69 мембранного маркера ранней активации [25] и Толл-подобных рецепторов (TLR-2) [17; 52; 178; 198; 215].

Активированные Т-лимфоциты регулируют иммунный ответ благодаря изменению продуцируемых ими цитокинов. Так, например, увеличение уровня IFN- γ Т-хелперами 1 типа (клетки CD3+CD4+IFN- γ +) приводит к развитию провоспалительных реакций и активации фагоцитоза. Повышение количества IL-4, синтезируемого Т-хелперами 2 типа (CD3+CD4+IL-4+), стимулирует В-клеточное звено иммунитета [6; 11; 23; 25]. Следовательно, определение цитокинового профиля может иметь большое значение с точки зрения динамики и прогноза развития ИКБ [6; 11; 23].

В элиминации *Borrelia burgdorferi* большое значение имеют цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+), поскольку спирохета может персистировать как внеклеточно, так и внутриклеточно [103; 127].

Таким образом, использование рекомбинантных Аг из местных изолятов боррелий и оценка *in vitro* субпопуляций лимфоцитов и цитокинового профиля может привести к разработке клеточных тестов для ранней диагностики ИКБ.

1. 12. Заключение по обзору литературы

К настоящему времени получены многочисленные данные о биологически активных компонентах слюны иксодовых клещей, которые могут играть существенную роль в патогенезе ИКБ. Одной из их основной функцией является модификация иммунного ответа хозяина в месте укуса клеща, что облегчает проникновение, выживание и диссеминацию спирохет. С этой точки зрения белки слюны клеща могут быть перспективными мишенями при разработке новых иммуносупрессоров, антиклещевых и антиборрелиозных вакцин.

На текущий момент уже получены многочисленные данные по составу и иммуномодулирующим свойствам слюны *Ixodes scapularis*, *I. pacificus* и *I. ricinus* – основных переносчиков ИКБ в северной Америке и в Европе. На территории России основным переносчиком возбудителей природно-очаговых инфекций является *I. persulcatus*. К настоящему времени уже имеется информация по составу слюны *I. persulcatus* [4; 8], а также ведутся работы по оценке экспрессии ее иммунодоминантных компонентов в зависимости от стадии питания клеща [29; 30]. В то же время воздействие слюны *I. persulcatus* на иммунокомпетентные клетки организма млекопитающих практически не изучено, хотя доказано, что компоненты слюны у различных видов клещей могут существенно различаться.

Таким образом, изучение взаимодействия клещ-прокормитель с точки зрения иммунобиологии важно для понимания процессов питания клещей, передачи патогенов и теоретического обоснования для создания антиклещевых вакцин. Актуальность проблемы состоит в формировании у клещей устойчивости к химическим средствам защиты и неблагоприятным воздействием акарицидов на окружающую среду [61].

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ *Ixodes persulcatus* НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C

На сегодняшний день существует множество исследований, посвященных воздействию слюны в основном трех видов иксодовых клещей – *I. ricinus*, *I. pacificus* и *I. scapularis* на неспецифический (врожденный) и адаптивный иммунный ответ [81; 99; 106; 140; 175; 203].

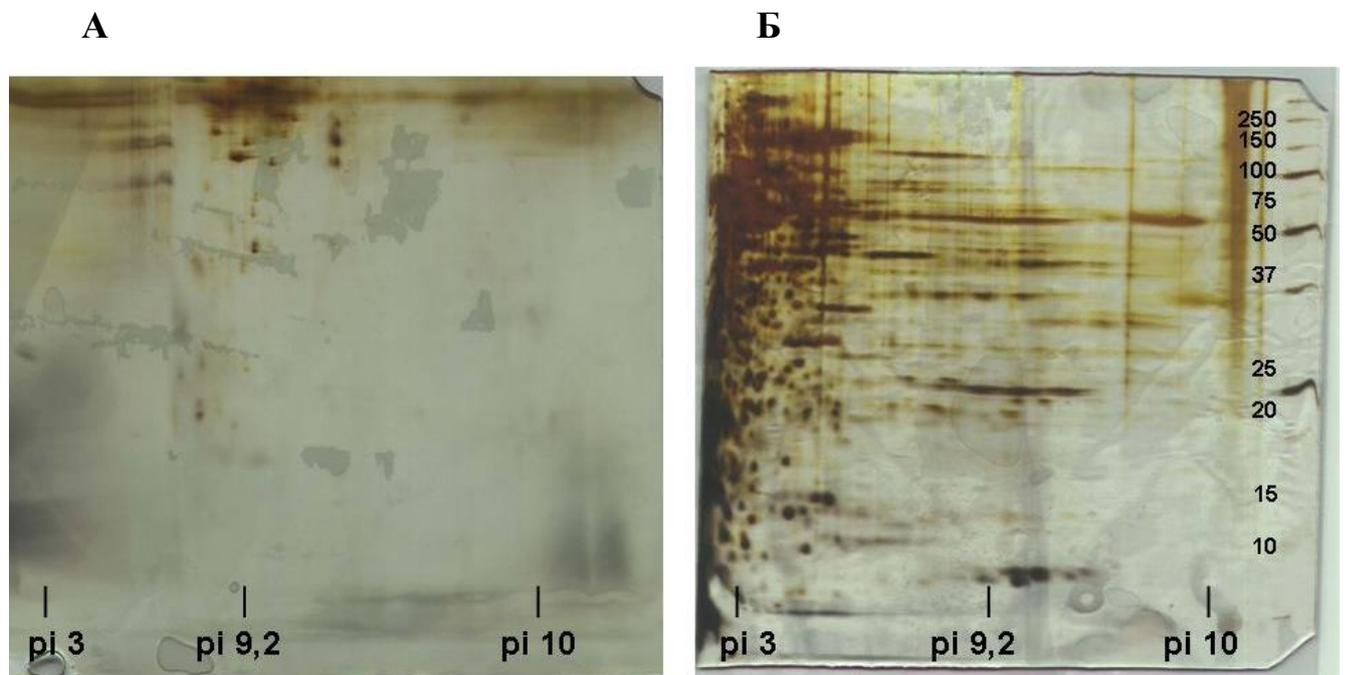
С нашей стороны представлялось интересным и актуальным провести исследования иммуномодулирующей активности слюны наименее изученного вида – *I. persulcatus*, учитывая его обширный ареал распространения в РФ и то, что клещи данного вида являются переносчиками различных возбудителей, в том числе ИКБ.

2.1. Характеристика экстракта слюнных желез

Известно, что слюна иксодовых клещей содержит сотни различных биологически активных веществ. Некоторые такие протеины экспрессируются на разных фазах питания клеща [91]. 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 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 температуре минус 80 °С.

Для электрофоретического анализа белкового состава препарата слюнных желез проводили изофокусирование в 16-сантиметровом 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

клетки. В случае ЭСЖН появляются интенсивно выраженные белковые зоны с различными молекулярными массами.

2.2. Влияние экстракта слюнных желез *I. persulcatus* на жизнеспособность иммунокомпетентных клеток

Первоначально, для исключения вклада цитотоксичности в иммуномодулирующие эффекты, провели анализ гибели ИКК мышей под действием различных концентраций ЭСЖ *I. persulcatus* с помощью МТТ-теста и цитометрического анализа клеток, окрашенных красителем 7 ААД.

Физиологическое состояние живых клеток оценивали по функционированию дегидрогеназ митохондрий. В результате взаимодействия сукцинатдегидрогеназы митохондриальной мембраны с желтой солью МТТ образуются кристаллы формазана фиолетового цвета, которые накапливаются в цитоплазме живых клеток. Количество формазана в цитоплазме клеточного монослоя является показателем уровня митохондриального дыхания, жизнеспособности клеток. Цитотоксический эффект определяли на 24, 48, 72 ч инкубирования спленоцитов с исследуемыми препаратами (ЭСЖН, ЭСЖГ, Salp15) (при температуре 37 °С, во влажной атмосфере 5 % CO₂, концентрация по белку – 0; 1; 10; 25; 50 мг/л).

При оценке жизнеспособности (функциональная активность клеток) было установлено, что оба экстракта (ЭСЖН и ЭСЖГ) не оказывали значительного влияния на жизнеспособность ИКК мышей в концентрациях до 50 мг/л: для ЭСЖГ – 92 %, для ЭСЖН – 96 %.

Аналогичные результаты получили при цитометрическом анализе окрашенных клеток 7 ААД.

У клеток в состоянии апоптоза/некроза изменяется проницаемость мембран. Краситель 7-ААД (7-амино-актиномицин D) проникает в такие клетки, окрашивая их ДНК. Живые клетки остаются 7-ААД (негативные), клетки на ранней стадии

апоптоза детектируются как 7-AADdim, на поздней стадии апоптоза/некроза – 7-AADbright. Метод позволяет провести точные определения состояния клеток.

Относительное количество погибших клеток в состоянии апоптоза/некроза при концентрации ЭСЖ 50 мг/л составило 2,3 %, что сопоставимо с контролем (рисунок 2).

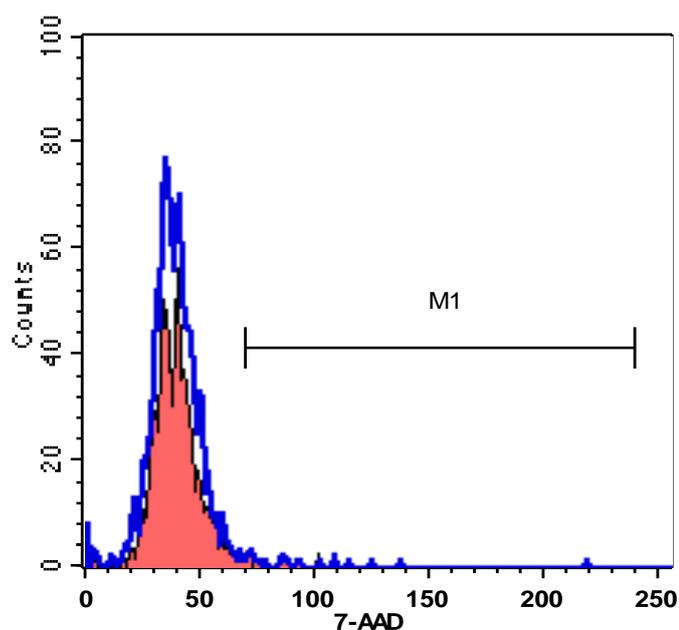


Рисунок 2 – Цитофлюориметрический анализ жизнеспособности спленоцитов мышей. Отрезок M1 показывает относительное количество не жизнеспособных клеток (%) в культуральной среде без ЭСЖ (заполненная цитограмма) и с ЭСЖ (пустая цитограмма)

Таким образом, даже при максимальной концентрации ЭСЖ *I. persulcatus* (50 мг/л) не оказывал значительного влияния на жизнеспособность ИКК мышей, следовательно, при оценке иммуносупрессирующего действия ЭСЖ следует исключить его цитотоксический эффект.

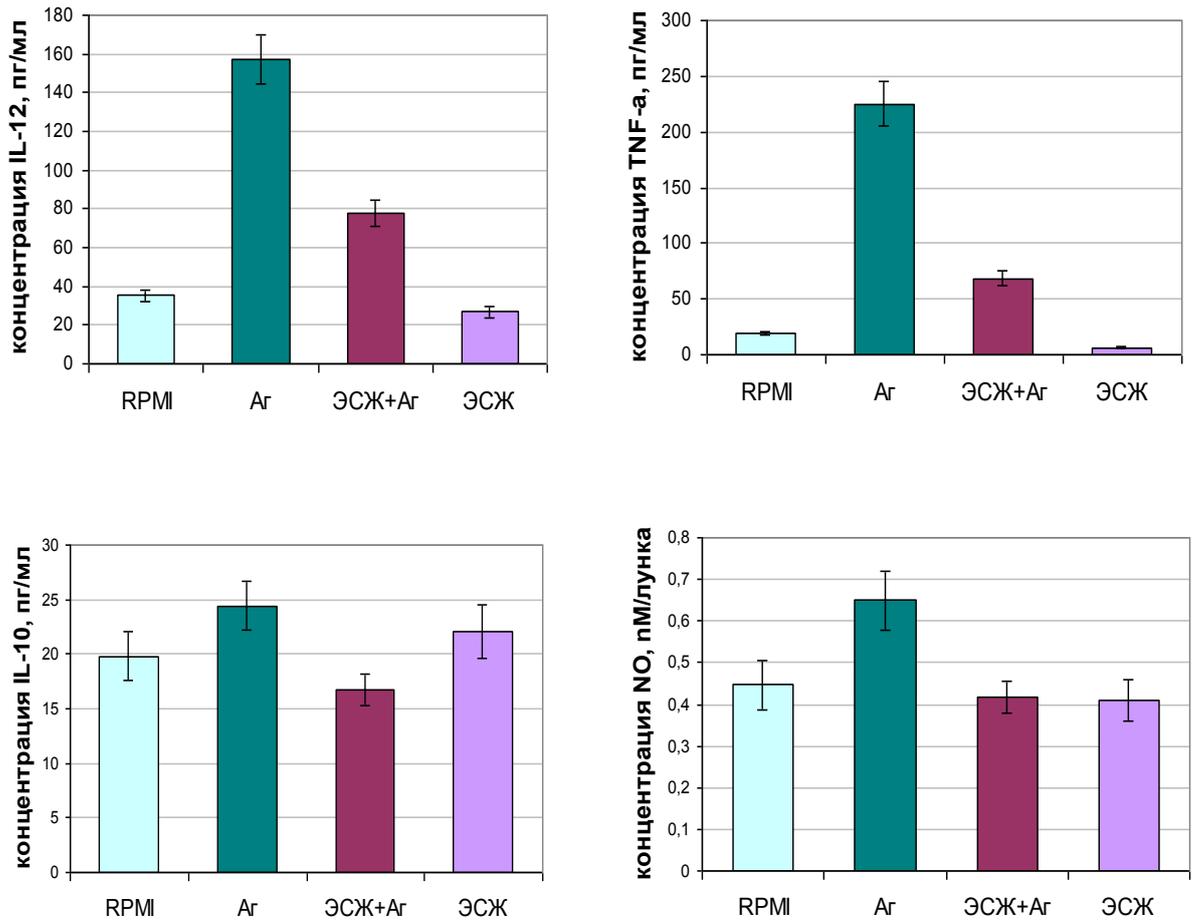
2.3. Оценка *in vitro* влияния экстракта слюнных желез на макрофаги мышей

Исследования воздействия слюны клещей на неспецифический иммунный ответ провели на костномозговых макрофагах (КММ) мышей, которые служили моделью фагоцитарного звена иммунитета. Для определения иммуномодулирующего действия ЭСЖ на КММ оценили продукцию цитокинов IL-12, TNF- α , IL-10 и NO на фоне стимуляции этих клеток полным клеточным антигеном *B. afzelii* H-13 (Ag).

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 3.

Как видно из рисунка 3, уровень продукции цитокинов и NO увеличивался в присутствии Ag. 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 ЭСЖ существенного влияния не оказывал, уровень синтеза цитокинов и NO оставался сопоставимым с контролем.

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о супрессирующем действии ЭСЖ, хотя в этих работах показано уменьшение продукции изучаемых цитокинов и NO не только макрофагами, но и другими типами фагоцитарных клеток под воздействием экстрактов других видов клещей [69, 105, 151, 160, 174].



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

Рисунок 3 – Влияние экстракта слюнных желез частично-напитавшихся клещей на функциональное состояние макрофагов мышей в системе *in vitro*

Супрессирующее действия ЭСЖ на процессы антигенной активации макрофагов *in vitro* вероятно могут быть реализованы и *in vivo* в снижении фагоцитарной активности клеток в месте укуса клеща, а так же в уменьшении воспалительных реакций, которые обеспечиваются нормальной продукцией цитокинов и хемокинов.

Это мы можем предположить, поскольку аутокринное действие TNF- α на макрофаги приводит к их активации и индукции кислородного взрыва, а IL-12 индуцирует синтез IFN- γ . Увеличение количества IFN- γ приводит к значительной активации макрофагов [25, 28]. Таким образом, уменьшение продукции этих цитокинов в результате действия слюны, может приводить к снижению способности к фагоцитозу.

Исходя из полученных результатов по супрессирующему действию экстракта на продукцию исследуемых цитокинов, может наблюдаться подавление ряда иммунных реакций как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

2.4. Оценка *in vitro* воздействия экстракта слюнных желез *I. persulcatus* на клетки адаптивного иммунитета интактных мышей

Для оценки воздействия ЭСЖ на клетки адаптивного иммунитета в качестве критериев учитывали изменения в экспрессии поверхностных ко-стимуляторных рецепторов, по которым можно судить о функциональном состоянии лимфоцитов.

Так же, учитывая, что Т-лимфоциты регулируют иммунный ответ благодаря изменению ими продукции цитокинов, определение цитокинового профиля (IFN- γ и IL-4 Т-клеток) может иметь большое значение с точки зрения исследования динамики баланса Тх-1/Тх-2.

Определение изменения рецепторного состава лимфоцитов. Сравнительную оценку воздействия ЭСЖГ и ЭСЖН 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. Для этого, клетки культивировали в течение 48 часов без стимуляции (отрицательный контроль); в присутствии митоген-активаторов (МА) (положительный контроль): КонА (5 мг/л) или ЛПС (10 мг/л) (SIGMA); в присутствии МА и ЭСЖ *I. persulcatus* (5; 25 или 50 мг/л). После окончания срока культивирования, проводили

цитометрический анализ и вычисляли индекс стимуляции (ИС=А/Б, 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).

Как следует из таблицы 1, оба ЭСЖ снижали ответ на активацию митогеном Т-лимфоцитов, регистрируемый по экспрессии на клетках CD69 рецептора (CD3+CD69+ Т-лимфоциты). Наиболее сильным влиянием, как следует из результатов, обладает ЭСЖН: в концентрации 5 мг/л наблюдается двукратное уменьшение CD3+CD69+ субпопуляции. ЭСЖГ вызывает аналогичный эффект только в концентрации 25-50 мг/л.

Таблица 1 – Индекс стимуляции субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные рецепторы CD69, TLR-2, TLR-4 в культуре спленоцитов под действием экстракта слюнных желез *I. persulcatus*

Субпопуляции лимфоцитов		ИС лимфоцитов на митоген	ИС лимфоцитов на митоген при различных концентрациях ЭСЖ					
			Концентрация ЭСЖ голодных клещей			Концентрация ЭСЖ частично питавшихся клещей		
			5 мг/л	25 мг/л	50 мг/л	5 мг/л	25 мг/л	50 мг/л
Т-лимфоциты	CD3+CD69+	8,6±1,3	6,4±1,2	2,4±0,7	2,4±0,8	3,8±0,9	3,6±0,9	3,5±0,8
	CD3+TLR-2+	3,3±0,9	3,4±0,8	4,1±0,9	4,0±0,8	2,2±0,7	2,9±0,8	1,3±0,6
	CD3+TLR-4+	2,5±0,8	3,8±0,8	3,3±0,8	3,7±0,9	2,1±0,7	1,9±0,6	1,2±0,5
В-лимфоциты	CD19+CD69+	13,8±1,6	13,0±1,5	37,9±4,2	36,8±3,9	17,4±1,9	11,7±1,5	5,3±1,0
	CD19+TLR-2+	2,4±0,7	1,8±0,5	1,5±0,6	1,3±0,5	2,0±0,7	2,1±0,8	1,5±0,6
	CD19+TLR-4+	2,0±0,8	1,9±0,6	2,4±0,7	3,3±0,8	1,9±0,7	2,2±0,6	2,0±0,6

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

Воздействие на экспрессию других рецепторов TLR-2 и TLR-4 было неоднозначным. При всех изученных концентрациях ЭСЖГ незначительно увеличивал количества CD3+TLR-2+ и CD3+TLR-4+ клеток, а ЭСЖН, наоборот, на эти субпопуляции лимфоцитов вызывал супрессивное действие, которое достигало статистически значимых значений при концентрации 50 мг/л.

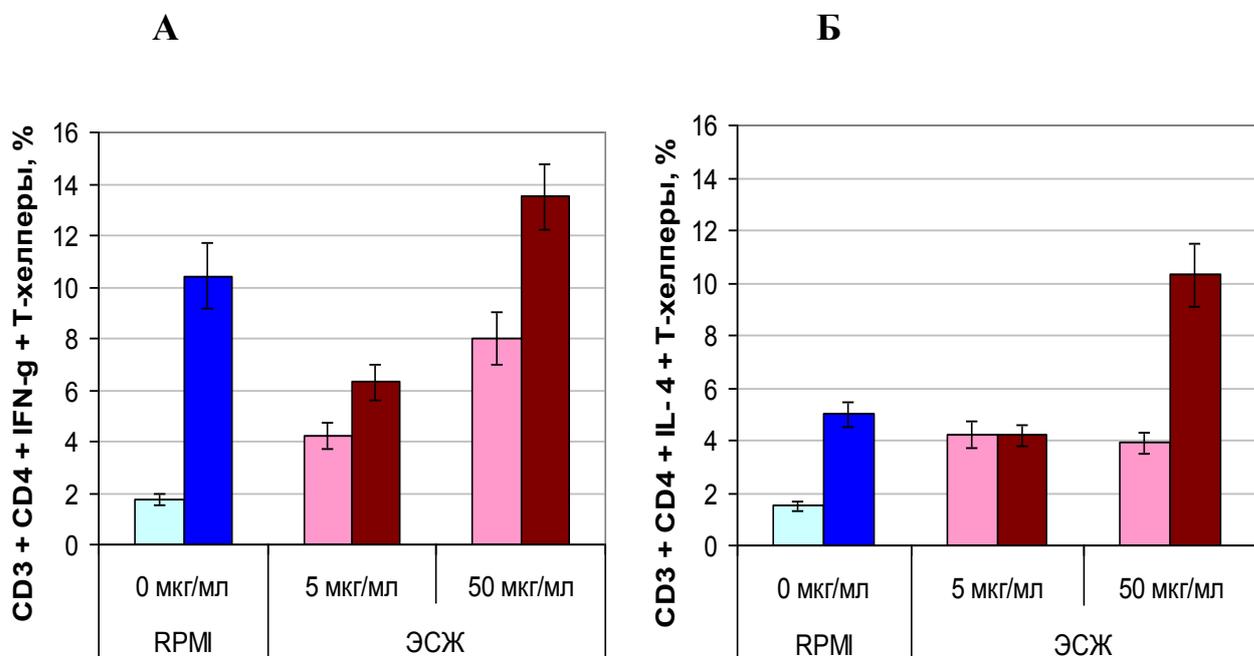
В зависимости от степени насыщения клещей ЭСЖ оказывал противоположное влияние на субпопуляции активированных митогеном В-лимфоцитов (CD19+). Так повышение концентрации ЭСЖГ с 5 до 50 мг/л увеличивало ИС CD69+CD19+-лимфоцитов с 13,8 до 36,8. В отличие от этого, ЭСЖН в концентрации 50 мг/л более чем в 2,5 раза снижал ИС таких клеток.

В то же время оба ЭСЖ уменьшали субпопуляции CD19+TLR2+ клеток, но не CD19+TLR4+. ЭСЖН во всех концентрациях достоверно не изменял долю CD19+TLR-4+ клеток.

Влияние ЭСЖ на продукцию Т-хелперами (CD3+CD4+) цитокинов IFN- γ и IL-4. Иммуномодулирующее действие ЭСЖ *I. persulcatus* через изменение субпопуляционного состава лимфоцитов было подтверждено в экспериментах *in vitro* по оценке доли субпопуляции CD3+CD4+Т-лимфоцитов продуцирующей цитокины IFN- γ и IL-4 (рисунок 4). Для выявления внутриклеточных цитокинов IFN- γ и IL-4 в клеточные культуры, культивируемые при тех же условиях, что и в предыдущем эксперименте, за 4 часа до окончания инкубирования вносили BD GogiPlug™, а в положительный контроль – BD Leukocyte Activation Cocktail с GolgiPlug™.

Установили, что содержание Т-хелперов, синтезирующих IFN- γ и IL-4, культивируемых без ЭСЖ составило 1,7 и 1,5 %, соответственно, а в положительном контроле (стимуляция клеток Leukocyte Activation Cocktail с GolgiPlug™) эти показатели возрастали до 10,4 и 5 %, соответственно. На диаграммах показано, что ЭСЖГ в концентрации 50 мг/л стимулировал увеличение доли субпопуляции CD3+CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN- γ в 4,7 раза, а IL-4 – в 2,6 раза по сравнению с контролем. Эффект ЭСЖН был более

значительным по сравнению с ЭСЖ: 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 напитавшихся клещей

Рисунок 4 – 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*

Полученные нами результаты по изменению экспрессии поверхностных рецепторов и внутриклеточных цитокинов у лимфоцитов свидетельствуют о том, что характер воздействия ЭСЖ может меняться в зависимости от степени насыщения клещей.

Так, например, уменьшение ИС Т-лимфоцитов и отсутствие ингибирования В-клеток свидетельствует о меньшем супрессивном эффекте ЭСЖГ. Увеличение субпопуляции активированных В (CD19+CD69+)-лимфоцитов возможно связано с разными путями активации лимфоцитов. Так, в частности, активация В-лимфоцитов происходит непосредственно через В-клеточные рецепторы, которые подобно антителам связывают нативные антигены. Для Т-лимфоцитов требуется участие АПК и образование синаптических ко-рецепторных взаимодействий. Нельзя исключать в этом процессе действие самого экстракта непосредственно на АПК (например, макрофаги), супрессирующее действие которого было продемонстрировано нами ранее (п. 3.2.). Тогда же был отмечен более слабый эффект ЭСЖГ по сравнению с ЭСЖН на фагоциты.

Так же наблюдали увеличение количества TLR-4+В-клеток под действием ЭСЖГ, в то время как количество CD19+TLR2+ клеток – уменьшалось, что, вероятно, связано с агонистическим взаимодействием TLR-2 и TLR-4, так как для В-клеток сигнал от TLR-4 – предпочтительней. Такое предположение можно сделать исходя из исследований группы ученых (Hayashi et al), которые отмечают влияние TLR-2 и TLR-4 рецепторов на процессы созревания В-клеток [109].

Полученные данные по иммуносупрессирующему действию ЭСЖН *I. persulcatus* на МА лимфоциты находят подтверждение в работе других исследователей, в которой изучали экстракт, полученный от другого вида клещей – *I. ricinus* и был продемонстрирован подобный дозозависимый эффект на МА спленоциты [140].

В результате снижения доли субпопуляций активированных Т-лимфоцитов и повышение синтеза IL-4, возможно подавление развития 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 [4; 61; 115; 140; 182].

Кроме того, полученные данные подтверждают гипотезу о направлении развития иммунного ответа компонентам слюнных желез *I. persulcatus* преимущественно по Th-2 типу [61; 140], 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 значительный 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-напитавшихся клещей.

ГЛАВА 3. ФОРМИРОВАНИЕ У МЫШЕЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАРАЖЕНИЮ БОРРЕЛИОЗОМ 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, к числу которых относятся *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus*, *D. variabilis* [53, 61, 188, 206, 207]. Результаты проведенных исследований, тем не менее, не освещают 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.

3.1. Оценка *in vitro* формирования у мышей иммунного ответа на экстракт слюнных желез

Поскольку исследователями уже установлено, что в формирование антиклещевой резистентности вносит вклад как гуморальный, так и клеточный компонент иммунитета [202], мы провели оценку специфической активации лимфоцитов и уровня иммуноглобулинов в сыворотках сенсibilизированных мышей. Наиболее репрезентативные данные по клеточному ответу следующие:

Определение количества активированных CD 69⁺-лимфоцитов. Согласно полученным ранее данным, в культуре активированных митогеном спленоцитов от интактных мышей, ЭСЖН оказывал иммуносупрессирующее действие, снижая количество CD 69⁺ лимфоцитов в 2,5 раза. Проведенная оценка *in vitro* в культуре активированных митогеном спленоцитов сенсibilизированных животных

показала увеличение количества активированных субпопуляций лимфоцитов в присутствии ЭСЖН.

В результате 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 2).

Таблица 2 – Индекс стимуляции субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные рецепторы CD69, в 48-часовой культуре спленоцитов под действием экстракта слюнных желез *I. persulcatus* и митогена

Субпопуляции лимфоцитов	Количество циклов кормления	ИС лимфоцитов на митоген	ИС лимфоцитов на митоген при различных концентрациях ЭСЖ		
			5 мг/л	25 мг/л	50 мг/л
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±2,0	24,3±2,1	23,6±2,2	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*

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.

Таким образом, при формировании клеточного иммунного ответа у сенсibilизированных мышей выявили увеличение доли активированных субпопуляций лимфоцитов в ответ на специфический индуктор – ЭСЖН. Для оценки динамики развития иммунного ответа при сенсibilизации повторными напусками клещей, использование CD69+CD19+ лимфоцитов затруднительно, поскольку данный показатель не коррелирует с кратностью насыщения клещей.

Определение активированных субпопуляций CD 28+ и TLR-2+-лимфоцитов провели после сенсibilизации мышей трехкратным кормлением нимф, так как в этом случае, как было установлено, сформирован антиклещевой иммунитет.

Определение количества активированных CD 28+-лимфоцитов. Отсутствие ЭСЖН в культуре митоген-активированных лимфоцитов приводило к значительному увеличению экспрессии CD 28 ко-рецепторов на сенсibilизированных Т-лимфоцитах по сравнению с интактными Т-лимфоцитами. В результате, при подсчете ИС лимфоцитов опытных животных (при стимуляции специфическим активатором – ЭСЖН), этот показатель достоверно не изменился по сравнению с контрольным (таблица 3).

Таблица 3 – Индекс стимуляции субпопуляций CD28+лимфоцитов сенсibilизированных мышей трехкратным кормлением *I. persulcatus* и влияние на него ЭСЖ, в 48-часовой культуре спленоцитов

Субпопуляции лимфоцитов	ИС лимфоцитов на митоген	ИС лимфоцитов на митоген и ЭСЖ (25 мг/л)
CD3+CD28+Т-лимфоциты контрольных мышей	1,2±0,9	1,3±0,8
CD3+CD28+Т-лимфоциты сенсibilизированных мышей	10,7±1,2	1,2±0,8

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

Определение количества активированных TLR-2+-лимфоцитов.

У сенсibilизированных животных установили достоверное увеличение количества митогенактивированных TLR-2+В-лимфоцитов по сравнению с интактными мышами. Увеличение доли TLR-2+В-клеток при специфической их стимуляции, так же подтверждает формирование иммунного ответа на компоненты слюны клеща (таблица 4).

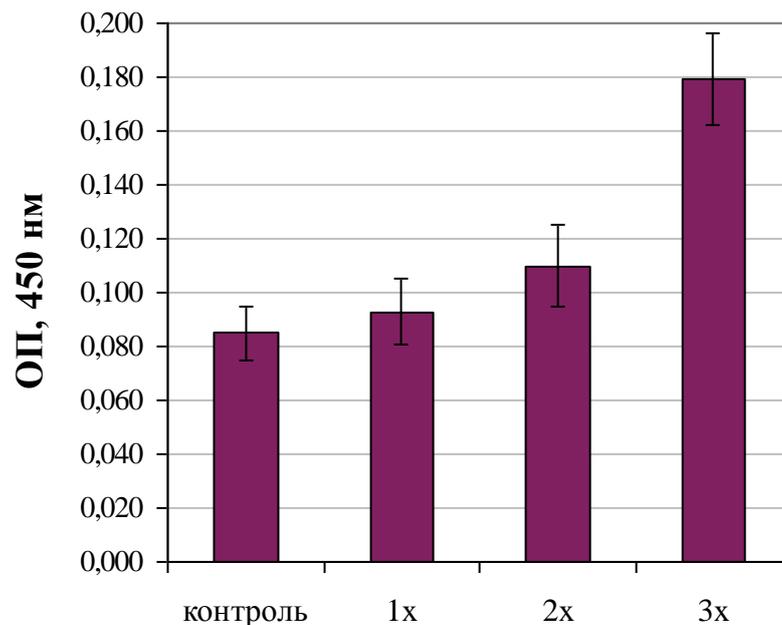
Таблица 4 – Индекс стимуляции субпопуляций TLR-2+лимфоцитов сенсibilизированных мышей трехкратным кормлением *I. persulcatus* и влияние на него ЭСЖ, в 48-часовой культуре спленоцитов

Субпопуляции лимфоцитов	ИС лимфоцитов на митоген	ИС лимфоцитов на митоген и ЭСЖ (25 мг/л)
CD19+TLR-2+В-лимфоциты контрольных мышей	1,7±0,7	0,8±0,4
CD19+TLR-2+В-лимфоциты сенсibilизированных мышей	3,5±0,8	3,5±0,7

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

Определение уровня иммуноглобулинов в сыворотках сенсibilизированных мышей. Определение уровня Аг у сенсibilизированных животных было обосновано литературными данными о корреляции титров специфических антител, которые образуются на клещевые Аг, с уровнем резистентности у животных к клещам [4].

Анализ гуморального иммунитета у мышей с помощью ИФА (рисунок 5) показал, что достоверное увеличение концентрации специфических иммуноглобулинов регистрировали только после третьего кормления, которая превышала контрольные показатели в 2 раза (судя по показателю оптической плотности (ОП) при разведении сывороток 1:10).



1х; 2х; 3х – кратности питания нимф. Разведение сыворотки 1:10.

Рисунок 5 – Данные ИФА по увеличению количества IgG к экстракту слюнных желез частично-напитавшихся клещей в сыворотках мышей с различной кратностью кормления на них клещей *I. persulcatus*

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 *I. persulcatus* иммунного ответа на ЭСЖ. Наши результаты по клеточному ответу согласуются с данными группы ученых, где ЭСЖ другого вида икодовых клещей – *D. andersoni* индуцировал *in vitro* бластогенез лимфоцитов, полученных от резистентных морских свинок [206]. Так же анализ гуморального иммунитета методом ИФА подтверждается исследованиями Григорьевой [7]. В своей работе она показала увеличение в среднем в 1,24 раза содержания Ат в крови рыжих полевок после первого и второго кормления на них *I. persulcatus* по сравнению с показателями сывороток контрольных полевок. Полученные нами результаты согласуются с данными упомянутой работы, однако достоверное увеличение концентрации специфических Ат мы регистрировали только после третьего иммунизирующего кормления.

3.2. Оценка *in vivo* антиклещевого иммунитета у мышей

Полученные данные экспериментов *in vitro* по оценке ИС субпопуляций лимфоцитов (CD3+CD69+ и CD19+TLR-2+) под действием ЭСЖН и увеличение количества специфических IgG показали, что для формирования иммунного ответа у мышей необходимо не менее трехкратного напуска на них клещей.

Устойчивость сохранения гуморального иммунного ответа у трехкратно сенсibilизированных мышей подтверждалась даже через 1,5 года и титр специфических IgG был на том же уровне, в то время как показатели у одно- и двукратно сенсibilизированных мышей были достоверно сопоставимы с контролем. Наши данные согласуются с результатами, полученными в другой научной работе [53], где продолжительность иммунитета у кроликов составляла около 9 месяцев, после четырехкратного питания на них *I. ricinus* [53].

Полученные *in vitro* результаты по формированию антиклещевого иммунитета у сенсibilизированных мышей получили дальнейшее подтверждение при изучении динамики количества напивавшихся клещей.

Оценка антиклещевого иммунного ответа у сенсibilизированных мышей по продолжительности питания на них клещей.

При подсчете количества напивавшихся и отпавших клещей определили, что 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. Статистически значимых различий в массе тела отпавших клещей в зависимости от числа кормлений отмечено не было.

Полученные нами экспериментальные данные подтверждаются общеустановленным фактом, что питание клещей на резистентных хозяевах вызывает удлинение времени питания, снижение процента перелинявших личинок и нимф и другие изменения основных физиологических показателей клещей [4; 7; 61; 202]. Таким образом, уменьшение числа отпавших насытившихся нимф *I. persulcatus* является достоверным критерием, подтверждающим формирование антиклещевого иммунитета у мышей.

Как было сказано выше, существуют отличия в развитии резистентности на различные виды клещей у различных видов животных. Так, например, на сенсibilизированных морских свинках смогло насытиться 10-20 % из всех напущенных личинок такого вида иксодовых клещей, как *D. andersoni*, по сравнению с первым кормлением (90-99 %). Таким образом, большая часть личинок не смогла осуществить полноценное питание на сенсibilизированных животных [206]. А в работе Wikel et al [207] отмечено, что при кормлении на

мышьях линии BALB/c процент достигших насыщения нимф клещей вида *I. scapularis* не показал развитие приобретенного антиклещевого иммунитета.

В литературе предложены различные схемы развития резистентности. Так, например, на мышьях линии BALB/c использовали четырехкратное иммунизирующее кормление нимф *I. ricinus* [207]. Для других видов животных эти показатели отличаются: для морских свинок используют однократное кормление клещей вида *D. andersoni* [206], для кроликов – четырехкратное кормление *I. ricinus* [53]. В случае *I. persulcatus*, достаточно их трехкратного кормления для развития антиклещевого иммунитета у мышьях линии BALB/c, что для изучаемого вида клещей показано впервые.

3.3. Устойчивость мышьях к заражению возбудителями боррелиоза через укус клеща

Протективность сформированного антиклещевого иммунитета, установленного экспериментами *in vitro* и *in vivo*, была подтверждена при инфицировании боррелиями через укус клещей.

В результате напуска нимф на мышьях (по 10 мышьях в группе) после трехкратного кормления на них клещей, (10 нимф/мышьях, зараженных либо изолятом *B. afzelii* H13, либо изолятом *B. garinii* Siu), определили устойчивость к заражению животных боррелиями. Зараженность оценивали через 6 недель после отпадения насосавшихся клещей по обсемененности боррелиями органов и тканей мышьях с помощью ПЦР-РВ и высева образцов в среду BSK II. Как видно из таблицы 5, независимо от вида возбудителя ИКБ количество инфицированных мышьях, сенсibilизированных повторными кормлениями на них клещей, снижалось до 20 % при заражении через укус клеща.

Таблица 5 – Сравнение обсемененности боррелиями органов у трехкратно сенсибилизированных и контрольных мышей

Вид боррелий в инфицированных клещах	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 группа	100	100	100	100
	Сенсибилизированная группа	10	20	20	0
<i>B. afzelii</i> H13	Контрольная группа	100	100	100	100
	Сенсибилизированная группа	10	0	20	0

Органы и ткани всех контрольных животных содержали клетки боррелий или ДНК. В тех случаях, когда из биоптатов выделяли чистые культуры, все они соответствовали штаммам, которыми были заражены клещи.

Таким образом, не менее 80 % мышей, сенсибилизированных повторными кормлениями незараженных боррелиями нимф *I. persulcatus*, становятся невосприимчивыми к возбудителям ИКБ при укусе зараженных клещей. Наши результаты согласуются с литературными данными о снижении (до 17 %) количества зараженных боррелиями через укус клещей мышей, которых предварительно четырехкратно сенсибилизировали путем питания на них нимф вида *I. scapularis* [207].

Таким образом, полученные данные по определению устойчивости к заражению сенсibilизированных мышей коррелируют с таковыми по клеточному и гуморальному иммунитету, а так же экспериментам *in vivo*.

Согласованность полученных данных *in vivo* и *in vitro* подтверждает возможность использования показателей клеточных тестов и ИФА как достоверные критерии при определении развития сенсibilизации мышей к клещевым покусам.

Так как сенсibilизация хозяина идет в основном за счет секретлируемых белков слюны, то наши результаты подтверждают, что белки слюны клещей *I. persulcatus* являются перспективными кандидатами в качестве протективных антигенов для потенциальной антиклещевой вакцины.

ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА SALP15 КЛЕЩЕЙ *I. PERSULCATUS* И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ИММУНОГЕННЫХ, ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ

Установленное иммуномодулирующее действие ЭСЖ на врожденный и адаптивный иммунитет обусловлено присутствием иммуносупрессирующих белков в слюне. К числу таких белков, которые могут выступать в качестве протективных Аг, относится Salp15 [29; 30; 40; 114; 115; 116; 161]. Поскольку в литературе в основном описаны и исследованы свойства рекомбинантных белков Salp15, полученных от двух других видов иксодовых клещей – *I. scapularis* и *I. ricinus*, следовательно, актуально исследование действия на ИКК не только экстракта слюны, но и Salp15 *I. persulcatus*.

4.1. Получение и характеристика по чистоте рекомбинантного белка Salp15

Исходя из литературных данных, в основном для наработки рекомбинантного белка Salp15 используют культуру клеток *Drosophila S2*, трансфецированную рекомбинантной плазмидной ДНК на основе вектора pСОНУGRO, в котором ген *salp15* находится под контролем сильного эукариотического промотора. Полученные таким образом белки являются гликозилированными. Так были получены и в дальнейшем исследованы рекомбинантные белки Salp15 клещей вида *I. ricinus* и *I. scapularis* [40; 97; 116]. В нашем случае наработка белка осуществлялась в клетках *E. coli* штамма-продуцента.

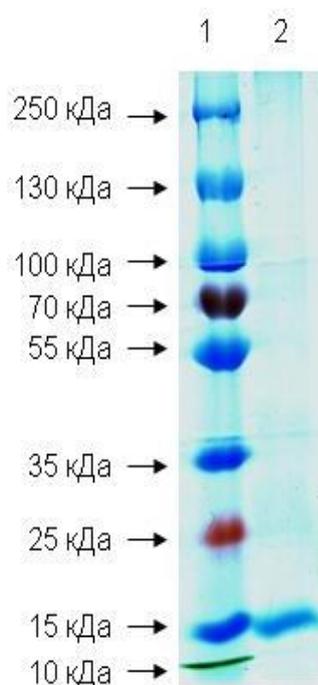
Для получения рекомбинантного белка Salp15, ген, кодирующий его синтез, был клонирован из слюнных желез *I. persulcatus*. Структурная часть гена, кодирующая зрелую форму белка Salp15, была получена методом ПЦР и клонирована в составе векторной ДНК pET32b под контроль сильного T7 промотора. Рекомбинантный штамм-продуцент *E. Coli* B1 21/pET Salp15 был

получен в результате трансформации штамма *E. coli* В1 21 рекомбинантной плазмидной ДНК рЕТ Salp15. Индукцию синтеза рекомбинантного белка Salp15 в клетках *E. coli* штамма-продуцента проводили при помощи IPTG. Для иммунодетекции и афинно-хроматографической очистки белка, С-конец Salp15 был слит с полигистидиновым доменом.

Индуцированную биомассу получили культивированием на среде НВ с антибиотиком до оптической плотности 0,6-0,8 (ОП₆₀₀) с последующей инкубацией в течение 3-4 часов при добавлении 1мМ IPTG. Биомассу осаждали центрифугированием при скорости вращения 6000 об/мин в течение 10 мин) на центрифуге G-21 (Beckman, США). Для получения целевого белка биомассу ресуспендировали в соответствующем буфере, а затем разрушили на ультразвуковом дезинтеграторе Virsonic (The VirTis Company, США), с последующим осаждением клеточного дебриса центрифугированием. Из супернатанта Salp15 был очищен с помощью аффинной хроматографии на сорбенте Iminodiacetic acid Sepharose (Sigma-Aldrich, США).

С целью подтверждения подлинности и определения чистоты рекомбинантного белка Salp15 перед его использованием в иммунологических экспериментах, он был охарактеризован с помощью ДДС электрофореза в 12 % ПААГ.

Анализ белка Salp15 *I. persulcatus* с помощью электрофореза показал, что он практически свободен от примесей других белков: чистота препарата по белку составила 95-98 %, молекулярная масса – 15,3 кДа (рисунок 6).



1 – маркер молекулярной массы; 2 – Salp15

Рисунок 6 – 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).

4.2. Изменение активности генов слюнных желез *I. persulcatus* в зависимости от стадии питания клещей

Измерения в ЭСЖ количества мРНК, транскрибируемой с 10 генов, ответственных за синтез Salp-протеинов, выявили четкие различия в их активности в зависимости от стадии питания клеща [29]. Наиболее значительные изменения в экспрессии наблюдали у генов *salp10* и *salp15*. Уже в самом начале питания клеща их активность постепенно повышалась и, в дальнейшем, увеличение синтеза мРНК приобретало экспоненциальный характер (таблица 6).

Это было показано с помощью ПЦР, когда в качестве матрицы для амплификации использовали уменьшающиеся концентрации одноцепочечной кДНК, синтезированной с мРНК, выделенной из слюнных желез голодных, частично и полностью напивавшихся клещей. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР показал, что, начиная с 3-х суток кормления на кролике, активность генов *salp10* и *salp15* возрастала на 2-3 порядка по сравнению с голодными клещами.

Таблица 6 – Изменение степени амплификации кДНК, отражающее активность генов *salp10* и *salp15* в зависимости от стадии питания клеща

Ген	Время питания				
	Голодный	1 сутки	3 суток	6 суток	8-10 суток
	Ц 1:10	Ц 1:10 1:100	Ц 1:10 1:100	Ц 1:10 1:100	Ц 1:10 1:100
β -actin					
<i>salp-10</i>					
<i>salp-15</i>					

Указанная динамика активности генов позволяет рассматривать белки Salp10 и Salp15, как перспективные кандидаты в протективные антигены, поскольку экспрессия генов *salp10* и *salp15* начинается уже на ранних стадиях питания клеща, а их активность возрастает в десятки и сотни раз и держится на этом уровне до окончания третьей стадии быстрого питания клеща.

Качественные и количественные изменения белкового спектра, вероятно, также являются главной причиной выявленных в наших экспериментах различий в иммуномодулирующем действии ЭСЖГ и ЭСЖН на ИКК мышей.

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

Оценка гуморального иммунитета. После трехкратной иммунизации мышей рекомбинантным белком Salp15 титры специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови составляли 1:51200.

Определение наличия адаптивного клеточного иммунитета на белок Salp15. 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 в культуре спленоцитов интактных мышей при тех же концентрациях достоверно не изменялась (рисунок 7 А).

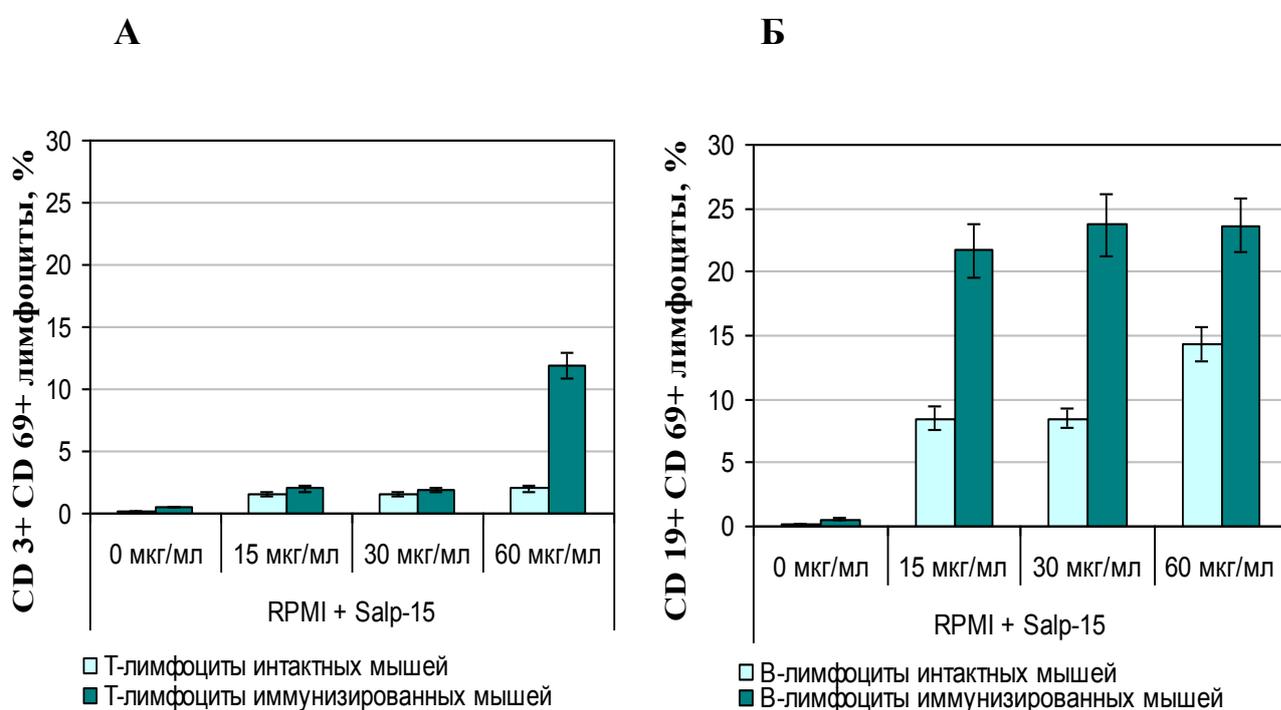


Рисунок 7 – Изменение процентного содержания активированных Т-лимфоцитов (А) и В-лимфоцитов (Б) под действием рекомбинантного белка Salp15 в культуре спленоцитов от сенсibilизированных и интактных животных

Количество специфически активированных В-лимфоцитов (CD19+CD69+) также увеличилось до 21,7-23,6 % по сравнению с 8,5-14,4 % у В-клеток от интактных мышей (рисунок 7 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 от 1 до 60 мг/л. Значения ОП опытных образцов относительно контроля (%) достоверно не отличались.

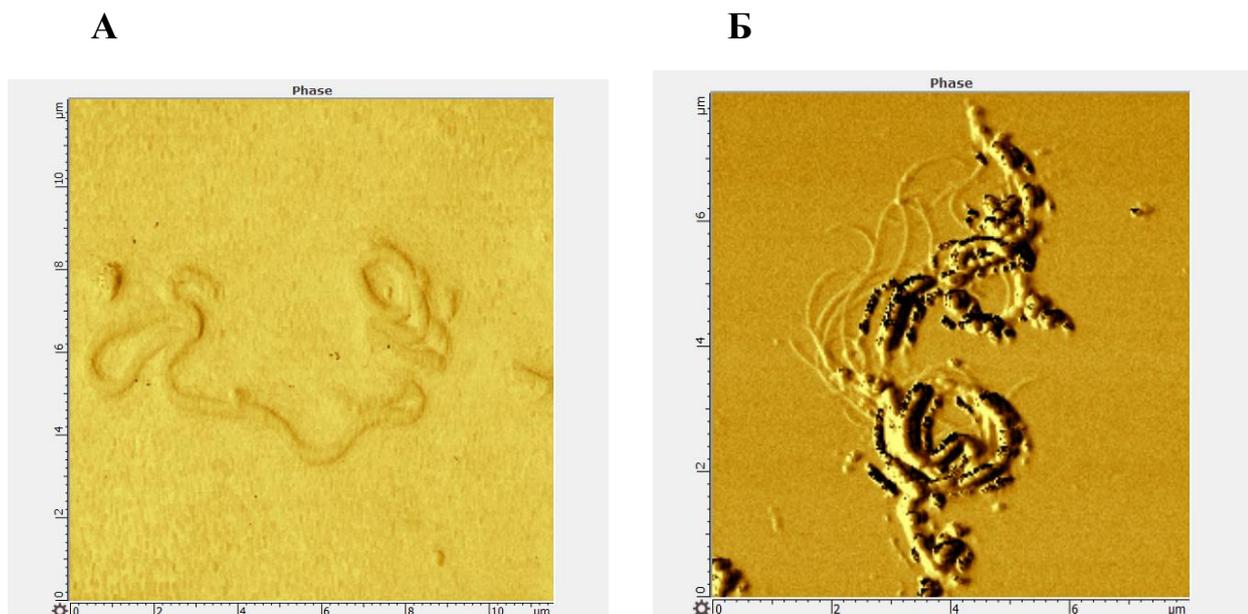
Таким образом, иммуно-химические и цитофлуориметрические исследования свойств рекомбинантного белка Salp15 *in vitro* подтверждают, что он обладает выраженной иммуногенностью.

4.4. Опсонизация рекомбинантным белком Salp15 *I. persulcatus* поверхности боррелий

Из литературных данных известно, что белок слюны клещей Salp15 адсорбируется на поверхности боррелий благодаря OspC. Таким образом, при попадании в организм хозяина, патоген оказывается прикрытым Salp15 от действия иммунных механизмов защиты [161].

В своих экспериментах с помощью сканирующей зондовой микроскопии нам удалось визуализировать процесс фиксации рекомбинантного белка Salp15 *I. persulcatus* на поверхности боррелий (рисунок 8).

Как видно на рисунке справа, на поверхности боррелии прикрепляются гранулы белка Salp15 (на изображении выглядят как темные глобулярные структуры), что хорошо сопоставимо с контрольным изображением боррелии (слева), не имеющей на своей поверхности подобных структур.



А – *B. afzelii* H-13 (контроль); Б - *B. afzelii* H-13, обработанные рекомбинантным белком Salp15

Рисунок 8 – Изображения боррелии (А) и фиксации на ее поверхности рекомбинантного белка Salp15 (Б), полученные на сканирующем зондовом микроскопе SmartSPM

Возможность связываться с поверхностью боррелий другого рекомбинантного белка клещей *I. ricinus* Salp15 Iric-1 была показана в работе Novius et al [116]. Методами отличными от представленного нами было доказано, что Salp15 Iric-1 связывается с мембранными белками Osp C боррелий трех штаммов от разных видов. Несмотря на то, что Salp15 Iric-1 отличается от полученного нами рекомбинантного Salp15 *I. persulcatus* тем, что он наработан в другой системе экспрессии (клеточная линия *Drosophila S2*) и, соответственно, находится в гликозилированной форме, однако оба они обладают способностью связываться с поверхностью боррелий.

Адгезия рекомбинантного белка Salp15 *I. persulcatus* к поверхностной мембране боррелий подтверждает его защитную функцию при их трансмиссии во время присасывания клеща. Направив иммунные механизмы хозяина на Salp15, вероятно, можно воспрепятствовать процессу проникновения боррелий из клеща и размножению их в области укуса.

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

После того, как был установлен иммунный ответ на рекомбинантный белок Salp15, мы оценили его способность защищать мышей, при инфицировании боррелиями через укус 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 10 мышей в группе). Зараженность мышей боррелиями оценивали через 6 недель после отпадения напитавшихся нимф с помощью ПЦР-РВ.

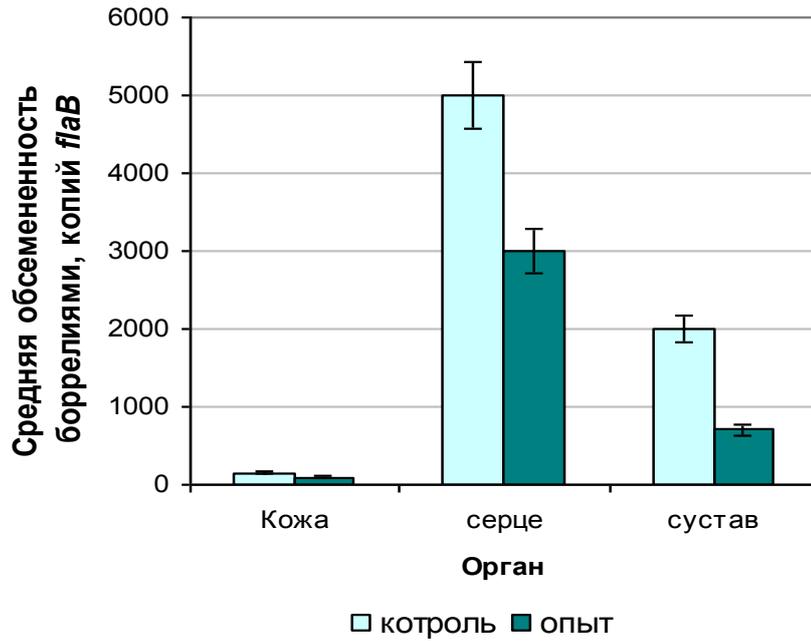


Рисунок 9 – Средняя обсемененность боррелиями тканей и органов мышей после иммунизации рекомбинантным белком Salp15 (определение с помощью ПЦР-РВ по числу копий *flaB*)

По результатам ПЦР-РВ анализа ДНК патогенных боррелий обнаружили в образцах органов и тканей как контрольных, так и иммунизированных животных. Однако обсемененность тканей у иммунизированных мышей была ниже на 40 % по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 9).

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

ГЛАВА 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИГЕНОВ БОРРЕЛИЙ В КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТАХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАРАЖЕНИЯ БОРРЕЛИОЗОМ МЫШЕЙ НА РАННЕЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ

При использовании в диагностике ИКБ клеточных тестов возникают определенные трудности и ограничения, которые могут быть обусловлены, прежде всего, сложностью стандартизации применяемых боррелиозных Аг (клеточные лизаты боррелий или культуральные супернатанты) [191].

Тем не менее, такой подход может оказать значительную пользу и дополнить серологические методы в случае установления диагноза на ранних стадиях развития ЛБ, а так же при сомнительных результатах. Использование только хорошо охарактеризованных рекомбинантных специфических боррелиозных Аг может способствовать устранению основных проблем препятствующих внедрению данного метода.

5.1. Получение и характеристика по чистоте рекомбинантных белков DbrA и ВВК32

Ген, кодирующий синтез белка DbrA был клонирован из *Borrelia afzelii*. Структурная часть гена, кодирующая зрелую форму белка DbrA, была получена методом ПЦР и клонирована в составе векторной ДНК pET32b под контроль сильного T7 промотора. Рекомбинантный штамм-продуцент *E. coli* B1 21/pET dbpA Az был получен в результате трансформации штамма *E. coli* B1 21 рекомбинантной плазмидной ДНК pET dbpA. Рекомбинантный белок DbrA синтезируется в клетках *E. coli* штамма-продуцента при индукции синтеза при помощи IPTG. Для иммунодетекции и афинно-хроматографической очистки белка, С-конец DbrA был слит с полигистидиновым доменом.

Ген *bbk32* (1083 п.о.), кодирующий синтез белка ВВК32 был клонирован из хромосомной ДНК *Borrelia afzelii* методом ПЦР. Фрагмент ДНК, размером

1083 п.о. был клонирован в составе плазмидного вектора pBad myc his под контроль арабинозного промотора. Рекомбинантный штамм-продуцент *E. coli* LMG 194/pBad ВВК32 был получен в результате трансформации штамма *E. coli* LMG 194 рекомбинантной плазмидной ДНК pBad ВВК32.

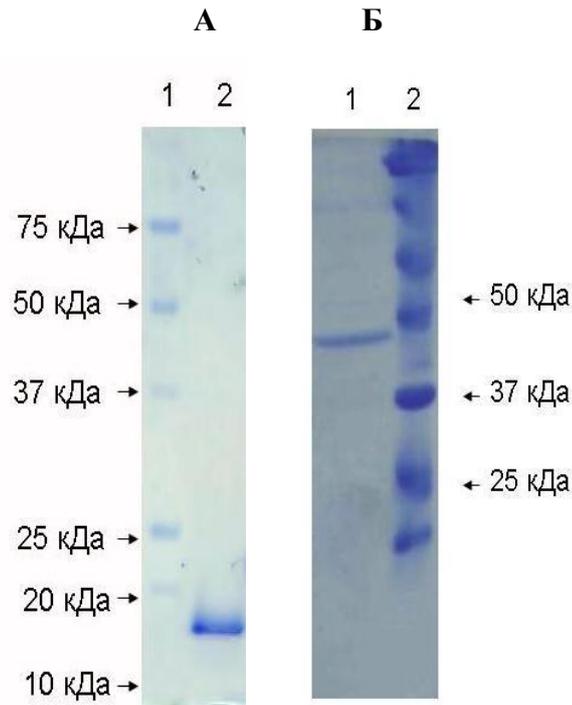
Рекомбинантный белок ВВК32 синтезируется в клетках *E. coli* штамма-продуцента при индукции синтеза при помощи 0,2 % арабинозы. Для иммунодетекции и афинно-хроматографической очистки белка, С-конец ВВК32 был слит с полигистидиновым доменом.

Индуцированную биомассу получили культивированием на среде НВ с антибиотиком до оптической плотности 0,6-0,8 (ОП₆₀₀) с последующей инкубацией в течение 3-4 часов при добавлении соответствующего индуктора. Биомассу осаждали центрифугированием при скорости вращения 6000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге G-21 (Beckman, США). Для получения целевого белка биомассу ресуспендировали в соответствующем буфере, а затем разрушили на ультразвуковом дезинтеграторе Virsonic (The VirTis Company, США), с последующим осаждением клеточного дебриса центрифугированием. Из супернатанта рекомбинантные белки были очищены с помощью аффинной хроматографии на сорбенте Iminodiacetic acid Sepharose (Sigma-Aldrich, США).

С целью подтверждения подлинности и определения чистоты рекомбинантных белков DbpA и ВВК32 перед их использованием в иммунологических экспериментах, эти Аг были охарактеризованы с помощью ДДС электрофореза в 12 % ПААГ.

Анализ рекомбинантных Аг 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: DbpA *B. afzelii* – 18 кДа; ВВК – 44 кДа (рисунок 10).

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



А: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – DbrA;

Б: 1 – ВВК; 2 – маркер молекулярной массы

Рисунок 10 – Электрофорез препаратов рекомбинантных белков в 12 % полиакриламидном геле

5.2. Определение специфической активации лимфоцитов антигенами боррелий

Одной из основных задач при решении проблемы активации лимфоцитов является выбор антигенов, обладающих достаточной специфичностью. Анализируя данные литературы [35, 191] и наши предварительные исследования, мы остановили свой выбор на иммунодоминантных антигенах боррелий ВВК32 и DbrA. В тех экспериментах, когда использовали синтетический пептид из 26 аминокислот, являющийся иммунодоминантной частью белка VlsE и полный клеточный антигена боррелий *B. afzelii* Н-13, мы не получили достоверных и воспроизводимых результатов в течение первых 48 дней развития инфекции у

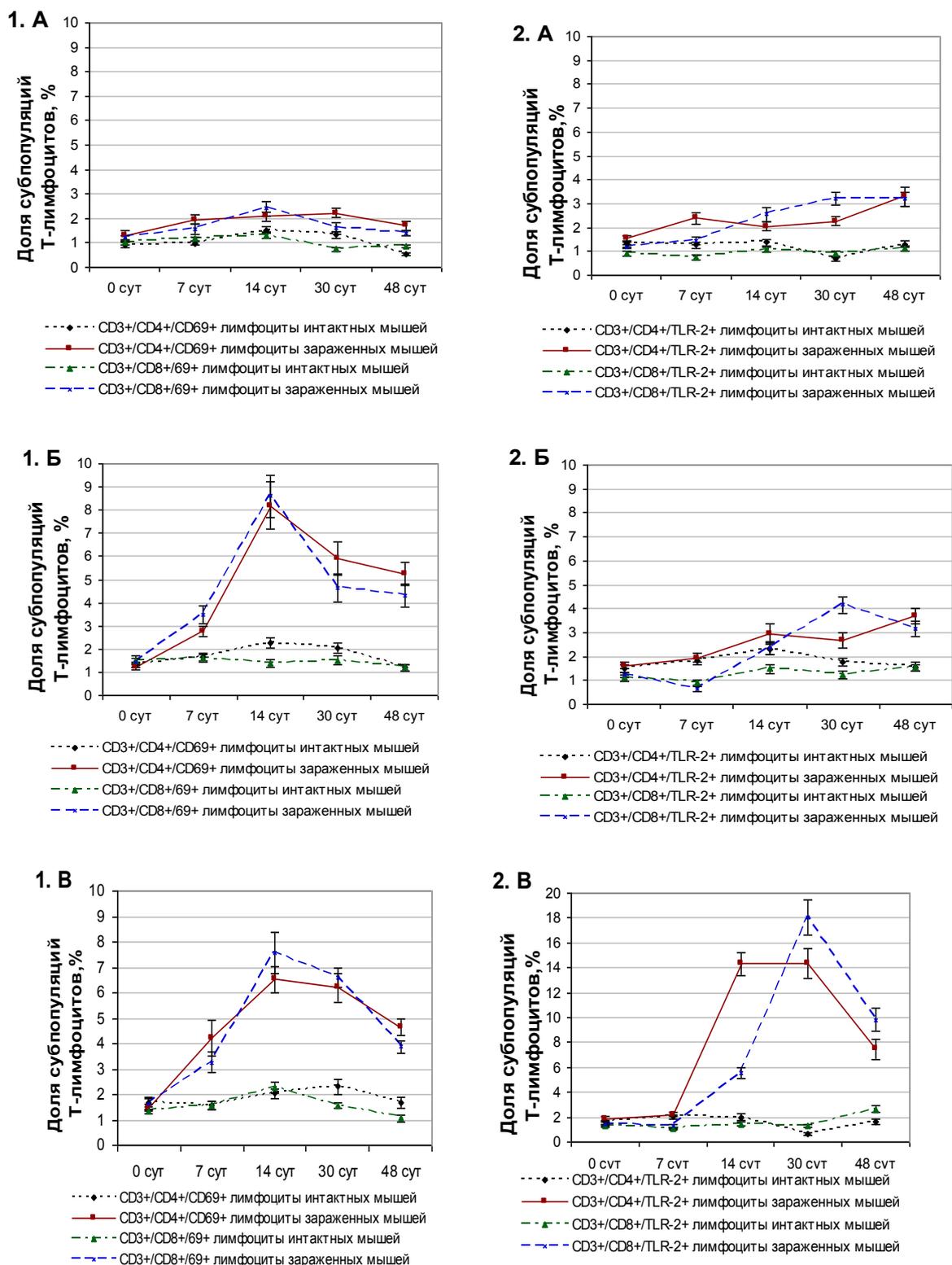
мышей. Поэтому в дальнейших исследованиях использовались только антигены ВВК32 и DbrA.

Действие боррелиозных антигенов в культуре спленоцитов мышей изучали на различных субпопуляциях лимфоцитов. При отсутствии в культуральной среде боррелиозных Аг в культурах спленоцитов от инфицированных мышей установили увеличение в 1,3-3,6 раза количества активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ - CD3+CD8+) и Т-хелперов (Т-х - CD3+CD4+) с CD69 и TLR-2 рецепторами по сравнению с контрольной группой животных. Такие показатели регистрировали на протяжении всех сроков исследования: 7, 14, 30, 48 сутки после заражения животных (рисунок 11, 1.А и 2.А).

При культивировании спленоцитов от интактных мышей с рекомбинантными белками боррелий ВВК32 или DbrA доля Т-х и ЦТЛ с CD69 и TLR-2 рецепторами не превышала 2,3 и 2,7 %, соответственно (рисунок 11).

У инфицированных мышей, количество активированных ВВК32 или DbrA субпопуляций ЦТЛ – CD3+CD8+CD69+ и Т-х – CD3+CD4+CD69+ к 7 суткам повышалось примерно в 2 раза, а на 14-48 сутки – в 3-4 раза (рисунок 11, 1.Б и 1.В) по сравнению с клеточными культурами без добавления Аг.

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 14-30 сутки после заражения. Присутствие ВВК32 в клеточной культуре сопровождалось увеличением аналогичных субпопуляций Т-лимфоцитов не более чем в 1,4 раза (рисунок 11, 2.Б и 2.В).

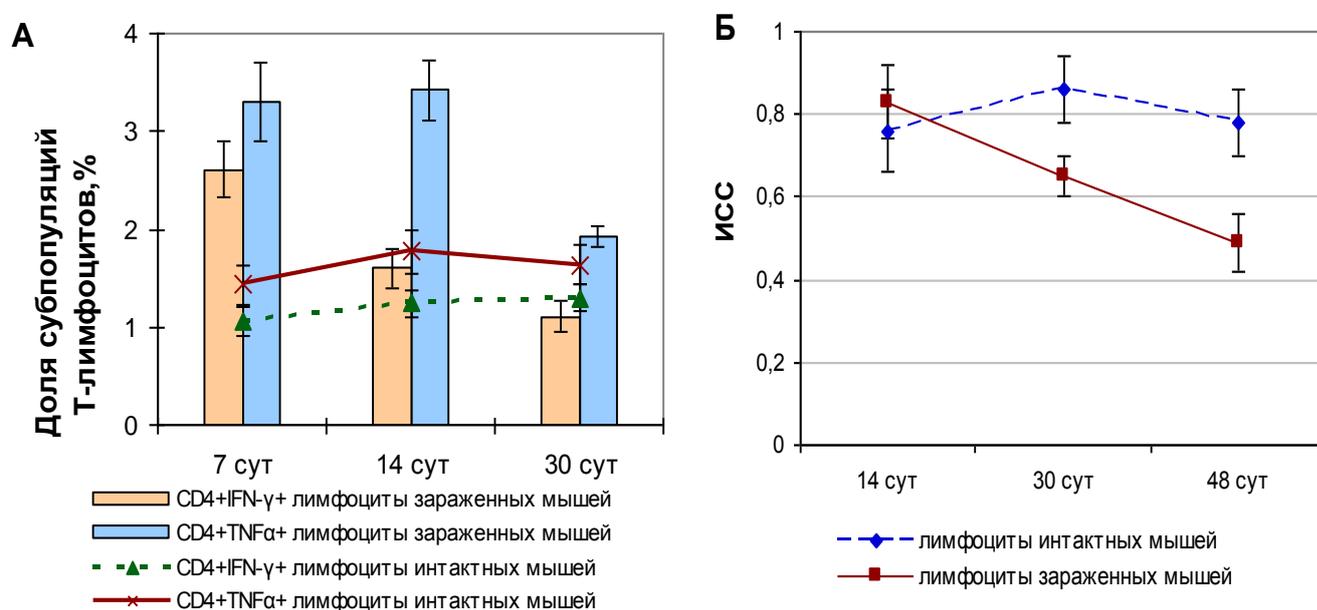


А – в среде RPMI-1640 (контроль); Б – в присутствии в культуральной среде ВВК32; В – в присутствии в культуральной среде DbrA

Рисунок 11 – Динамика изменения относительного количества субпопуляций Т-лимфоцитов в культуре спленоцитов от intactных и зараженных *Borrelia afzelii* Н-13 мышей

5.3. Определение цитокинового профиля инфицированных мышей

Для определения динамики цитокинового профиля изучили изменения синтеза Т-хелперами провоспалительных (IFN- γ , TNF- α) и противовоспалительного (IL-4) цитокинов. У инфицированных мышей через неделю после заражения доля Т-хелперов, продуцирующих провоспалительные цитокины (CD4+IFN- γ + и CD4+TNF- α +) увеличилась в 2-2,5 раза. Однако в дальнейшем доля CD4+IFN- γ + клеток снижалась и на 14 сутки показатели возвращались к значениям, характерным для интактных животных (рисунок 12. А).



А – субпопуляции Т-хелперов, синтезирующих провоспалительные цитокины IFN- γ (CD4+IFN- γ +) и TNF- α (CD4+TNF- α); Б – Индекс соотношения субпопуляций лимфоцитов Тх-1(CD4+IFN- γ)/Тх-2(CD4+IL-4+)

Рисунок 12 – Динамика изменения содержания Т-хелперов, продуцирующих провоспалительные и противовоспалительные цитокины в культуре спленоцитов интактных и зараженных чистой культурой *B. afzelii* Н-13 мышей BALB/c

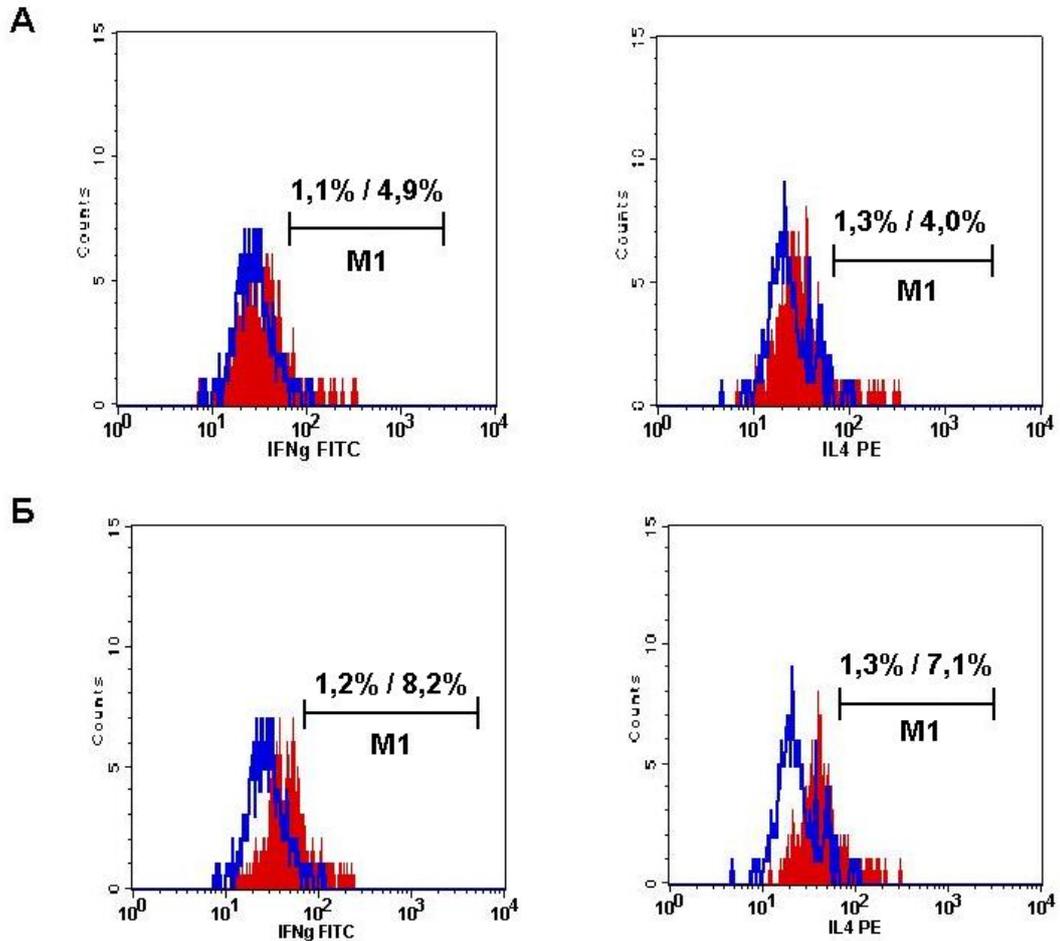
Снижение содержания CD4+TNF- α -клеток в популяции Т-х у зараженных животных происходило медленнее и достигало уровня интактных животных только к 30 суткам (рисунок 12 А). Вероятно, эти изменения связаны с особенностями межклеточных взаимодействий антигенов боррелий с иммунокомпетентными клетками и внутриклеточными сигнальными путями [153]. Напротив, доля Тх, синтезирующих IL-4, увеличивалась, что видно из соотношения между субпопуляциями Тх-2 (CD4+IL-4+) и Тх-1 (CD4+IFN- γ +) (рисунок 12 Б).

Подсчет индекса соотношения субпопуляций (ИСС) позволил определить динамику баланса Тх-1/Тх-2 иммунного ответа организма [6; 11; 23]. На 14 сутки после заражения соотношение Тх-1/Тх-2 (ИСС) составило 0,83, что было сопоставимо с показателями контрольных клеток, для которых ИСС = 0,76. К 30 суткам развития боррелиоза ИСС уменьшился до 0,65, а спустя 1,5 месяца – до 0,49, что свидетельствует об увеличении субпопуляции Тх-2 и уменьшение субпопуляции Тх-1 (рисунок 12 Б). Такие результаты подтверждают, что в иммунопатогенезе боррелиоза ведущую роль играют механизмы гуморального иммунитета [21].

5.4. Определение изменений в уровне синтеза цитокинов Т-хелперами, при их специфической активации антигенами боррелий

В случае тестирования боррелиозных Аг на способность специфически стимулировать увеличение синтеза Тх 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 до 48 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

(рисунок 13). 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 М1 показывает относительное количество клеток (%) в культуральной среде с Аг (заполненная цитограмма) и без Аг (пустая цитограмма). 14 сутки после заражения

Рисунок 13 – 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.

Поскольку при развитии инфекционного заболевания сенсibilизация Т-клеток может быть выявлена раньше и точнее, чем продукция специфических антител, то изучение Т-клеточного иммунного ответа на конкретные антигены боррелий может оказать значительную пользу при разработке новых иммунодиагностических тестов.

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 напивавшиеся 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 DbrA и ВВК32 *B. afzelii* Н13 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 напитавшихся 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 ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ,
СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

Аг -	антиген, антигены
АДФ -	аденозин дифосфат
АМФ -	аденозин монофосфат
АПК -	антиген-презентирующие клетки
Ат -	антитело, антитела
АТФ -	аденозин трифосфат
БСА -	бычий сывороточный альбумин
ДСН -	додецилсульфат натрия
ИКБ (ЛБ) -	иксодовые клещевые боррелиозы (Лайм боррелиозы)
ИКК -	иммунокомпетентные клетки
ИС -	индекс стимуляции
ИСС -	индекс соотношения субпопуляций
ИФА -	иммуноферментный анализ
кДНК -	комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
КММ -	костномозговые макрофаги
КонаА -	конканавалин А – митоген для Т-клеток
ЛПС -	липополисахарид – В-клеточный митоген
МА -	митоген-активатор
МКАТ -	моноклональные антитела, меченные флуорохромом
МНТЦ -	международный научно-технический центр
МТТ -	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
МЭ -	мигрирующая эритема
ППС -	полная питательная среда RPMI-1640
ПЦР-РВ -	полимеразная цепная реакция в реальном времени
Тх -	Т-хелперы (субпопуляции Т-хелперных лимфоцитов первого
(Тх-1 и Тх-2)	типа и второго типа)

ФСБ -	фосфатно-солевой буфер
ЦТЛ -	цитотоксические Т-лимфоциты
ЭСЖ- (ЭСЖГ/ЭСЖН)	экстракт слюнных желез клещей (голодных/частично-насыщенных)
7 AAD -	краситель 7 – амино-актиномицин D
APC -	флуорохромный краситель Allophycocyanin
ВВК32 -	фибронектин связывающий Ag боррелий
BSK-II -	среда для культивирования боррелий (от Barbour-Stoenner-Kelly II)
CD -	лейкоцитарный поверхностный антиген (от Cluster Differentiation)
DbrA -	декорин-связывающий протеин боррелий
FITC -	флуорохромный краситель Fluorescein isothiocyanate
GM-CSF -	колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (от Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor)
GP -	коммерческий препарат BD GolgiPlug™ (BD Biosciences), содержащий ингибитор транспорта белков
IFN- γ -	интерферон гамма
Ig - (Ig G, IgM, IgE)	иммуноглобулин (иммуноглобулины классов G, M, E)
IL -	интерлейкин
LAC/GP -	коммерческий препарат Leukocyte Activation Cocktail with BD GolgiPlug™ (BD Biosciences) для активации цитокин-продуцирующих клеток, содержащий ингибитор транспорта белков
MHC (MHC-I/MHC-II)	главный комплекс гистосовместимости (гены главного комплекса гистосовместимости класса I/класса II) (от Major Histocompatibility Complex)
NO -	оксид азота

OD -	оптическая плотность
OspA, OspC, OspE	поверхностные протеины боррелий A, C, E (от outer surface protein)
PE -	флуорохромный краситель Phycoerythrin
PerCP -	флуорохромный краситель Peridinin chlorophyll protein
Salp -	белки слюны клещей
SDS PAGE -	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TGF- β -	трансформирующий фактор роста бета (от Transforming Growth Factor)
TLR -	Toll-подобный рецептор (от Toll-Like Receptor)
TNF- α -	фактор некроза опухоли альфа (от Tumor Necrosis Factor)
TROSPA -	рецепторы на поверхности клеток средней кишки клещей, которые взаимодействуют с OspA боррелий (от <u>T</u> ick <u>R</u> ecceptor for <u>O</u> spA)
VlsE -	поверхностный липопротеин боррелий

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амосова, Л.И. Сравнительное электронно-микроскопическое исследование слюнных желез паразитических и свободноживущих паразитоморфных клещей // Материалы IV Всероссийского Съезда Паразитологического общества при Российской академии наук «Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения»; под ред. К.В. Галактионова и А.А. Добровольского. Т. 1. – СПб.: «Лема», 2008. – 273 с.
2. Андрейчук, Ю.В. Перспективы лабораторной диагностики Лайм-боррелиоза. Проблемы клещевых и паразитарных заболеваний / Ю.В. Андрейчук, В.Н. Куликов, Н.К. Токаревич, А.Н. Усков, Ю.В. Лобзин // Материалы круглого стола в рамках VI Российско-итальянской науч. конф. «Инфекционные болезни: диагностика, лечение, профилактика», 14-16 декабря 2000 г. – СПб, 2000. – С. 104-112.
3. Балашов, Ю.С. Особенности паразитарной системы иксодовый клещ-позвоночное животное // Паразитология. – 1992. – Т. 26, вып. 3. – С. 185-197.
4. Балашов, Ю.С. Иксодовые клещи – паразиты и переносчики инфекций. – СПб.: Наука, 1998. – 287 с.
5. Балашов, Ю.С. Значение популяционной структуры иксодовых клещей (PARASITIFORMES, IXODIDAE) для поддержания природных очагов инфекции // Зоологический журнал. – 2010. – Т. 89, №1. – С. 18-25.
6. Бургасова, О.А. Особенности содержания цитокинов в сыворотке крови больных иксодовым клещевым боррелиозом с различными клиническими проявлениями / О.А. Бургасова, Г.Я. Ценева, А.Н. Усков, Н.Е. Гринченко // Микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2010. – № 3. – С. 67-71.
7. Григорьева, Л.А. Морфофизиологические изменения в организме питающихся клещей иксодин (Ixodinae), взаимодействие клещей с организмом хозяина и патогенами: автореф. дис... д-ра биол. наук. – СПб., 2007. – 39 с.

8. Григорьева, Л.А. Морфофункциональные изменения слюнных желез самок иксодовых клещей подсемейств Ixodinae и Amblyomminae (Acari; Ixodidae) во время питания и их значение / Л.А. Григорьева, Л.И. Амосова // Журнал эволюции биохимии и физиологии. – 2008. – № 6. – С. 622-635.

9. Дятлов, И.А. Перспективы создания вакцин против укуса клеща для неспецифической профилактики трансмиссивных заболеваний: обзор / И.А. Дятлов, С.Ф. Бикетов, В.В. Фирстова // Микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2011. – № 4. – С. 101-106.

10. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.

11. Железникова, Г.Ф. Роль Гамма-интерферона в иммунопатогенезе инфекций (обзор литературы) // Клин. лаб. диагностика. – 2008. – № 4. – С. 3-8.

12. Кокряков, В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. – СПб.: Наука, 2006. – 261 с.

13. Коренберг, Э.И. Иксодовые клещевые боррелиозы как группа заболеваний человека и главные итоги её изучения в России // Журнал инфекц. патол. – 1996. – Т. 3. – С. 22-24.

14. Коренберг, Э.И. Изучение и профилактика микстинфекций, передающихся иксодовыми клещами // Вестник РАМН. – 2001. – № 11. – С. 41-45.

15. Коренберг, Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегия их профилактики: изменение приоритетов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – № 5 (72). – С. 7-17.

16. Лабецкая, А.Г. Защитная реакция у млекопитающих при паразитировании иксодовых клещей. – Минск, 1990. – 158 с.

17. Лебедев, К.А. Иммунология образраспознающих рецепторов (интегральная иммунология) / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина. – М.: Книжный дом «Либроком», 2009. – 259 с.

18. Литвинова, Л.С. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л.С. Литвинова, А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич, К.А. Кофанова, О.Г. Хазиахматова, В.В. Шуплецова, Е.В. Кайгородова, А.Г. Гончаров // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 7-26.

19. Макаренко, Л.А., Состояние иммунной системы при болезни Лайма / Л.А. Макаренко, М.И. Кудрина, И.Н. Побединская // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2002. – № 3. – С. 9-11.

20. Мейл, Д. Иммунология / Д. Мейл, Дж. Бростофф, Д.Б. Рот, А. Ройт. – М., 2007. – 568 с.

21. Миноранская, Н.С. Патогенетические и иммунологические особенности течения иксодовых клещевых боррелиозов // Сибирский медицинский журнал. – 2007. – № 1. – С. 5-9.

22. Москвина, Г.Г. О частоте генерализованной инфекции у взрослых клещей рода Ixodes в очагах боррелиозов России и США / Г.Г. Москвина, Э.И. Коренберг, Э. Спилман, Т.В. Щеглова // Паразитология. – 1995. – Т. 29, вып. 5. – С. 353-359.

23. Пичугина, Л.В. Внутриклеточные цитокины: проблемы детекции и клиническое значение / Л.В. Пичугина, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2008. – Т. 29, № 1. – С. 55-63.

24. Усков, А.Н. Клещевой энцефалит, эрлихоз, бабезиоз и другие актуальные клещевые инфекции в России / А.Н. Усков, Ю.В. Лобзин, О.А. Бургасова // Инфекционные болезни. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 83-92.

25. Хаитов, Р.М. Иммунология: учебник для студентов медицинских вузов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 320 с.

26. Хайдуков, С.В. Цитометрический анализ в клинической иммунологии / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, В.А. Черешнев. – Екатеринбург: УрО РАН, 2011. – 220 с.

27. Черешнев, В.А. Иммунологические механизмы локального воспаления / В.А. Черешнев, М.В. Черешнева // Мед. иммунол. – 2011. – Т.13, № 6. – С. 557-568.

28. Черешнев, В.А. Иммунология / В.А. Черешнев, К.В. Шмагель. – М.: Издательский дом «МАГИСТР-ПРЕСС», 2013. – 448 с.

29. Штанников, А.В. Изменение экспрессии генов слюнных желез *Ixodes persulcatus* (Ixodidae) в зависимости от стадии питания клеща / А.В. Штанников, О.Н. Перовская, Т.В. Решетняк, Т.В. Реполовская, Е.А. Панферцев, Е.Е. Сергеева, В.П. Гутова, И.С. Васильева, А.С. Ершова, А.Г. Прилипов, С.Ф. Бикетов, N. Zeidner // Мед. паразитол. – 2009. – № 1. – С. 40-44.

30. Штанников, А.В. Поиск протективных антигенов в экстрактах слюнных желез клеща *Ixodes persulcatus* (Ixodidae) / А.В. Штанников, Т.В. Решетняк, Т.В. Реполовская, Е.А. Панферцев, О.Н. Перовская, В.П. Гутова, И.С. Васильева, А.С. Ершова, А.Г. Прилипов, С.Ф. Бикетов, N. Zeidner // Мед. паразитол. – 2010. – № 2. – С. 36-39.

31. Межазакис, Ф.И. Эпидемиология, диагностика и профилактика клещевого энцефалита и клещевых боррелиозов. Паразитозы / Ф.И. Межазакис, Е.В. Соусова, Е.П. Гаврилова, Е.В. Тимофеева, И.Г. Техова, А.М. Герман, М.Г. Дарьина; под ред. Л.П. Зуевой. – СПб, 2006 – 36 с.

32. Ackerman, S. Passage of host serum components including antibody across the digestive tract of *Dermacentor variabilis* / S. Ackerman, B. Clare, T.W. McGill, D.E. Sonenshine // J. Parasitol. – 1981. – Vol. 67, N 6. – P. 737-740.

33. Agbede, R.I.S. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle / R.I.S. Agbede, D.H. Kemp // Intern. J. Parasitol. – 1986. – Vol. 16, N 1. – P. 35-41.

34. Agüero-Rosenfeld, M.E. Serodiagnosis in early Lyme disease / M.E. Agüero-Rosenfeld, J. Nowakowski, D.F. McKenna, C.A. Carbonaro, G.P. Wormser // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 3090-3095.

35. Agüero-Rosenfeld, M.E. Diagnosis of Lyme Borreliosis / M.E. Agüero-Rosenfeld, G. Wang, I. Schwartz, G.P. Wormser // Clin. Microbiol. Reviews. – 2005. – Vol. 18, N 3. – P. 484-509.

36. Allen, J.R. An overview of progress in characterizing host immunity to ticks // First Intern. conf. on tick-borne pathogens at the host-vector interface. Saint Paul (Minnesota). – 1992. – P. 206-211.

37. Allen, J.R. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs / J.R. Allen, H.M. Khalil, S.K. Wikel // J. of Immunol. – 1979. – Vol. 122. – P. 563-565.

38. Almeida, A.P.G. Cross-reactivity between hard tick (Ixodidae) antigens / A.P.G. Almeida, G.H. Bechara, M.G.R. Varma // Bull. Soc. franc. parasitol. – 1990. – Suppl. N 2. – P. 11-28.

39. Anguita, J. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host / J. Anguita, M.N. Hedrick, E. Fikrig // FEMS Microbiology Reviews. – 2003. – Vol. 27. – P. 493-504.

40. Anguita, J. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation / J. Anguita, N. Ramamoorthi, J.W. Hovius, S. Das, V. Thomas, R. Persinski, D. Conze, P.W. Askenase, M. Rincon, F.S. Kantor, E. Fikrig // Immunity. – 2002. – Vol. 16. – P. 849-859.

41. Anisuzzaman, M. Longistatin, a Plasminogen Activator, Is Key to the Availability of Blood-Meals for Ixodid Ticks / M. Anisuzzaman, K. Islam, M. Abdul Alim, T. Miyoshi, T. Hatta, K. Yamaji, Y. Matsumoto, K. Fujisaki, N. Tsuji // PLoS Pathog. – 2011. – Vol. 7, N 3. – P. 1-13.

42. Anisuzzaman, M. Longistatin is an unconventional serine protease and induces protective immunity against tick infestation / M. Anisuzzaman, K. Islam, M. Abdul Alim, T. Miyoshi, T. Hatta, K. Yamaji, Y. Matsumoto, K. Fujisaki, N. Tsuji // Mol. Biochem. Parasitol. – 2012. – Vol. 182. – P. 45-53.

43. Anthonissen, F.M. Evidence for the involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium / F.M. Anthonissen,

M. Dekesel, P.P. Hoet, G.H. Bigaignon // Res. Microbiol. – 1994. – Vol. 145. – P. 327-331.

44. Askenase, P.W. Cutaneous basophil-associated resistance to ectoparasites (ticks). I. Transfer with immune serum or immune cells / P.W. Askenase, B.G. Bagnall, M.J. Worms // Immunol. – 1982. – Vol. 45. – P. 501-511.

45. Baranton, G. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis / G. Baranton, D. Postic, I.S. Girons, P. Boerlin, J.C. Piffaretti, M. Assous, P.A. Grimont // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1992. – Vol. 42. – P. 378-383.

46. Barbour, A.G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes // Yale J. Biol. Med. – 1984. – Vol. 57. – P. 521-525.

47. Barriga, O.O. Antigens of *Amblyomma americanum* ticks recognized by repeatedly infested sheep / O.O. Barriga, F. Andujar, H. Sahibi, J. Andrzejewski // J. Parasitol. – 1991. – Vol. 77, N 6. – P.710-716.

48. Bechara, G.H. Immunisation of dogs, hamsters and guinea pigs against *R. sanguineus* using crude unfed adult tick extracts / G.H. Bechara, M.P.J. Szabo, L.S. Mukai, P.C.S. Rosa // Vet. Parasitol. – 1994. – Vol. 52. – P. 79-90.

49. Bell, J.F. Resistance to tickborne *Francisella tularensis* by tick-sensitized rabbits: allergic kendusity / J.F. Bell, J. Stewart, S.K. Wikel // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1979. – Vol. 28. – P 876-880.

50. Benach, J.L. Interactions of phagocytes with the Lyme disease spirochete: role of the Fc receptor / J.L. Benach, H.B. Fleit, G.S. Habicht, J.L. Coleman, E.M. Bosler, B.P. Lane // J. Infect. Dis. – 1984. – Vol. 150. – P. 497-507.

51. Ben-Yakir, D. Quantitative studies of host immunoglobulin G in the hemolymph of ticks // J. Med. Entomol. – 1989. – Vol. 26, N 2. – P. 243-246.

52. Bolz, D.D. MyD88 plays a unique role in host defense but not arthritis development in Lyme disease / D.D. Bolz, R.S. Sundsbak, Y. Ma, S. Akira, C.J. Kirschning, J.F. Zachary, J.H. Weis, J.J. Weis // J. Immunol. – 2004. – Vol. 173, N 3. – P. 2003-2010.

53. Bowessidjaou, J. Effects and duration of resistance acquired by rabbits on feeding and egg laying in *Ixodes ricinus* L / J. Bowessidjaou, M. Brossard, A. Aeschlimann // *Experient.* – 1977. – Vol. 33. – P. 548-550.

54. Bratu, S. Active immunisation against human tick-borne diseases / S. Bratu, L.I. Lutwick // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2002. – Vol. 2. – P. 187-195.

55. Brightbill, H.D. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors / H.D. Brightbill, D.H. Libraty, S.R. Krutzik, R.B. Yang, J.T. Belisle, J.R. Bleharski, M. Maitland, M.V. Norgard, S.E. Plevy, S.T. Smale, P.J. Brennan, B.R. Bloom, P.J. Godowski, R.L. Modlin // *Science.* – 1999. – Vol. 285. – P. 732-736.

56. Brossard, M. Immunity against *Ixodes ricinus* // First Intern. conf. on tick-borne pathogens at the host-vector interface. Saint Paul (Minnesota). – 1992. – P. 226-232.

57. Brossard, M. *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or reinfested rabbits / M. Brossard, V. Fivaz // *Parasitol.* – 1982. – Vol. 85. – P. 583-592.

58. Brossard, M. Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L: Humoral factors influence feeding and egg laying / M. Brossard, P. Girardin // *Experient.* – 1979. – Vol. 35. – P. 1395-1396.

59. Brossard, M. Progressive sensitization of circulating basophils against *Ixodes ricinus* L. antigens during repeated infestations of rabbits / M. Brossard, J.P. Monneron, V. Paptheodorou // *Parasite Immunol.* – 1982. – Vol. 4. – P. 355-361.

60. Brossard, M. Immunology of interactions between ticks and hosts / M. Brossard, S.K. Wikel // *Med. Vet. Entomol.* – 1997. – Vol. 11. – P.270-276.

61. Brossard, M. Tick immunobiology / M. Brossard, S.K. Wikel // *Parasitol.* – 2004. – Vol. 129. – P. S161-S176.

62. Brown, S.J. Cutaneous basophil responses and immune resistance of guinea pigs to ticks: passive transfer with peritoneal exudate cells or serum / S.J. Brown, P.W. Askenase // *J. Immunol.* – 1981. – Vol. 127. – P. 2163-2167.

63. Brown, S.J. *Amblyomma americanum*: sequential histological analysis of larval and nymphal feeding sites on guinea pigs / S.J. Brown, F.W. Knapp // Exp. Parasitol. – 1980. – Vol. 49. – P. 188-205.

64. Brown, S.J. *Amblyomma americanum*: sequential histological analysis of adult feeding sites on guinea pigs / S.J. Brown, F.W. Knapp // Exp. Parasitol. – 1980. Vol. 49. – P. 303-318.

65. Burke, G.S. Hypersensitivity to Tick and Lyme Disease / G.S. Burke, S.K. Wikel, A. Spielman, S.R. Telford, K. McKay, P.J. Krause // Risk. Emerg Infect Dis. – 2005. – Vol.11, N 1. – P. 36-41.

66. Camargo Mathias, M.I. Immunomodulatory effect of tick saliva / M.I. Camargo Mathias, K.C. Scopinho Furquim, P.H. Nunes // Invert. Surviv. J. – 2011. – Vol. 8. – P. 231-240.

67. Carroll, J.A. Effect of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi* / J.A. Carroll, C.F. Garon, T.G. Schwan // Infect. Immunol. – 1999. – Vol. 67. – P. 3181-3187.

68. Carreóna, D. Vaccination with BM86, subolesin and akirin protective antigens for the control of tick infestations in white tailed deer and red deer / D. Carreóna, J.M.P. de la Lastra, C. Almazán, M. Canales, F. Ruiz-Fons, M. Boadella, J.A. Moreno-Cid, M. Villar, C. Gortázar, M. Reglero, R. Villarreal, José de la Fuente // Vaccine. – 2012. – Vol. 30. – P. 273-279.

69. Cavassani, K.A. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells / K.A. Cavassani, J.C. Aliberti, A.R. Dias, J.S. Silva, B.R. Ferreira // Immunol. – 2005. – Vol. 114. – P. 235-245.

70. Coutte, L. Detailed analysis of sequence changes occurring during vlsE antigenic variation in the mouse model of *Borrelia burgdorferi* infection / L. Coutte, D.J. Botkin, L. Gao, S.J. Norris // PLoS Pathog. – 2009. – Vol. 5, N 2. – P. e1000293. doi:10.1371/journal.ppat.1000293.

71. De la Fuente, J. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with GavacTM against the cattle tick *Boophilus microplus* / J. De la Fuente,

M. Rodriguez, M. Redondo, C. Montero, J.C. Garcia-Garcia, L. Mendez, E. Serrano, M. Valdes, A. Enriquez, M. Canales, E. Ramos, O. Boue, H. Marchado, R. Lleonart, C.A. de Armas, S. Rey, J.L. Rodriguez, M. Artiles, L. Garcia // *Vaccine*. – 1998. – Vol. 16. – P. 366-373.

72. De Castro, J.J. Resistance in cattle against *Rhipicephalus appendiculatus* with an assessment of cross-resistance to *R. pulchellus* / J.J. De Castro, R.M. Newson, I.V. Herbert // *Exp. Appl. Acarol.* – 1989. – Vol. 6, N 2. – P. 237-244.

73. De Silva, A. M. Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks / A.M. De Silva, N.S. Zeidner, Y. Zhang, M.C. Dolan, J. Piesman, E. Fikrig // *Infect. Immunol.* – 1999. - Vol. 67. – P. 30-35.

74. Dickinson, R.G. Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus* / J.E. O'Hagan, M. Shotz, K.C. Binnington, M.P. Hegarty // *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* – 1976. - Vol. 54. - P. 475–486.

75. Diterich, I. Immunomodulation and new therapeutic strategies in Lyme borreliosis: Dr. Naturwissenschaften dis. Der Universität Konstanz (Fachbereich Biologie), 2003.

76. Diterich, I. Modulation of cytokine release in ex vivo stimulated blood from borreliosis patients / I. Diterich, L. Härter, D. Hassler, A. Wendel, T. Hartung // *Infect. Immunol.* - 2001. - Vol. 69. P. 695-705.

77. Dizij, A. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main european vector of *Borrelia burgdorferi* / A. Dizij, K. Kurtenbach // *Parasite Immunol.* - 1995. - Vol. 17. - P. 177-183.

78. Dresser, A.R. Investigation of the role of the genes involved in antigenic switching at the *vlsE* locus in *Borrelia burgdorferi*: an essential role for the RuvAB branch migrase / A.R. Dresser, P.O. Hardy, G. Chaconas // *PLoS Pathog.* - 2009.- Vol. 5(12): e1000680. doi:10.1371/journal.ppat.1000680.

79. Ecological dynamics of tick-borne zoonoses/ D. E. Sonenshine, T. N. Mather, eds. 1st ed. USA: Oxford University Press; 1994. – P. 327-350.

80. Eicken, C. Crystal Structure of Lyme Disease Variable Surface Antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi* / C. Eicken, V. Sharma, T. Klabunde, M.B. Lawrenz, J.M. Hardham, S.J. Norris, J.C. Sacchettini // *J. Biol. Chem.* – 2002. - Vol. 277(24). - P. 21691 – 21696.

81. Ferreira, B.R., Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice / B.R. Ferreira, J.S. Silva // *Immunol.* – 1999. - Vol. 96. - P. 434–439.

82. Ferreira, S.H. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia / S.H. Ferreira, B.B. Lorenzetti, S. Poole // *Br. J. Pharmacol.* – 1993. - Vol. 110. – P. 1227–1231.

83. Fikrig, E. Arthropod- and host-specific *Borrelia burgdorferi* bbk32 expression and the inhibition of spirochete transmission / E. Fikrig, W. Feng, S.W. Barthold, S.R. Telford, R.A. Flavell // *J. Immunol.* - 2000. - Vol. 164. – P. 5344–5351.

84. Fivaz, B.H. Immune suppression induced by the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* // *J. Parasitol.* – 1989. - Vol. 75. - P. 946–952.

85. Fivaz, B.H. Observations on successive infestations of the rabbit host by the ticks *Rhipicephalus appendiculatus* and *R. zambeziensis* (Acari: Ixodidae) / B.H. Fivaz, R.A.I. Norval // *Exp. Appl. Acrol.* – 1989. - Vol. 7. – P. 267–279.

86. Flisiac, I. Antibodies against *Borrelia afzelii* in patients with an early stage of Lyme disease / I. Flisiac, B. Chodynnicka // *Wiad. Lec.* – 2001. - Vol. 54. - P. 19-25.

87. Fomsgaard, A. Modification of the Silver Staining Technique To Detect Lipopolysaccharide in Polyacrylamide Gels / A. Fomsgaard, M.A. Freudenberg, C. Galanos // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. - Vol. 28, № 12. - P. 2627-2631.

88. Francis, J. Resistance of Droughtmaster cattle to tick infestation and babesiosis / J. Francis, D.A. Little // *Aust. Vet. J.* – 1964. - Vol. 40. – P. 247– 253.

89. Francischetti, I.M. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme

disease tick vector *Ixodes scapularis* / T.N. Mather, J.M. Ribeiro // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. - Vol. 305. – P. 869–875.

90. Francischetti, I.M. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis / I.M. Francischetti, T.N. Mather, J.M. Ribeiro // Thromb. Haemost. – 2005. - Vol. 94. – P. 167–174.

91. Francischetti, I.M. The role of saliva in tick feeding / I.M. Francischetti, A. Sá-Nunes, B.J. Mans, I.M. Santos, J.M. Ribeiro // Front Biosci. – 2009. - Vol. 14. – P. 2051–2088.

92. Francischetti, I.M. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex / I.M. Francischetti, J.G. Valenzuela, J.F. Andersen, T.N. Mather, J.M. Ribeiro // Blood. – 2002. - Vol. 99. – P. 3602–3612.

93. Frauenschuh, A. Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus* / A. Frauenschuh, C.A. Power, M. Deruaz, B.R. Ferreira, J.M. da Silva, M.M. Teixeira, J. Dias, T. Martin, T.N. Wells, A.E. Proudfoot // J. Biol. Chem. - 2007. Vol. 282(37). - P. 27250-27258.

94. Fukumoto, S. Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis / S. Fukumoto, T. Sakaguchi, M. You, X. Xuan, K. Fujisaki // Microvasc. Res. – 2006. - Vol. 71. – P. 218–221.

95. Ganapamo, F. Cytokine production by lymph node cells from mice infested with *Ixodes ricinus* ticks and the effect of tick salivary gland extracts on IL-2 production / F. Ganapamo, B. Rutti, M. Brossard // Scand. J. Immunol. - 1996. - Vol. 44. – P. 388–393.

96. Ganapamo, F. Identification of an *Ixodes ricinus* salivary gland fraction through its ability to stimulate CD4 T cells present in BALB/c mice lymph nodes draining the tick fixation site / F. Ganapamo, B. Rutti, M. Brossard // Parasitol. - 1997. - Vol. 115. – P. 91–96.

97. Garg, R. Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15 / R. Garg, I.J Juncadella, N. Ramamoorthi, Ashish, S.K. Ananthanarayanan, V. Thomas, M. Rincon, J.K. Krueger, E. Fikrig, C.M. Yengo, J. Anguita // *J. Immunol.* – 2006. - Vol. 177. – P. 6579–6583.

98. Giambartolomei, G.H. *Borrelia burgdorferi* Stimulates the Production of Interleukin-10 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Uninfected Humans and Rhesus Monkeys / G.H. Giambartolomei, V.A. Dennis, M.T. Philipp // *Infect. Immunol.* – 1998. - Vol. 66(6). – P. 2691-2697.

99. Gillespie, R.D. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis* / R.D. Gillespie, M.C. Dolan, J. Piesman, R.G. Titus // *J. Immunol.* – 2001. - Vol. 166. – P. 4319–4326.

100. Gillespie, R.D. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva / R.D. Gillespie, M.L. Mbow, R.G. Titus // *Parasit. Immunol.* - 2000. - Vol. 22. – P. 319–331.

101. Girardin, P. Effects of cyclosporin-A on the humoral immunity to ticks, and on the cutaneous immediate (type I) and delayed (type IV) hypersensitivity reactions to *Ixodes ricinus*, L. salivary gland antigens in re-infested rabbits / P. Girardin, M. Brossard // *Parasitol. Research.* - 1989. - Vol. 75. - P. 657-662.

102. Girardin, P. Rabbits infested with *Ixodes ricinus* L. adults: Effects of treatment with cyclosporin A on the biology of ticks fed on resistant or naive hosts / P. Girardin, M. Brossard // *Annals Parasitol. Hum. et Comparativ.* - 1990. - Vol. 65. – P. 262–266.

103. Girschick, H.J. Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells / H.J. Girschick, H.I. Huppertz, H. Russmann, V. Krenn, H. Karch // *Rheumatol. Int.* - 1996. - Vol. 16(3). - P. 125-132.

104. Grab, D.J. Fibrinectin-binding activity in *Borrelia burgdorferi* / D.J. Grab, C. Givens, R. Kennedy // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1998. - Vol. 1407. – P. 135-145.

105. Gwakisa, P. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide

by LPS-stimulated JA-4 cells / P. Gwakisa, K. Yoshihara, T.T. Long, H. Gotoh, F. Amano, E. Momotani // *Vet. Parasitol.* – 2001. - Vol. 99. – P. 53–61.

106. Hajnicka, V. Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission / V. Hajnicka, I. Vancova, P. Kocakova, M. Slovak, J. Gasperik, M. Slavikova, R.S. Hails, M. Labuda, P.A. Nuttall // *Parasitol.* – 2005. - Vol. 130. – P. 333–342.

107. Hajnicka, V. Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors / V. Hajnicka, I. Vancova, M. Slovak, P. Kocakova, P.A. Nuttall // *Int. J. Parasitol.* – 2011. - Vol. 41. – P. 213-223.

108. Hannier, S. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission / S. Hannier, J. Liversidge, J.M. Sternberg, A.S. Bowman // *Immunol.* – 2004. - Vol. 113. – P. 401–408.

109. Hayashi, E.A. Role of TLR in B Cell Development: Signaling through TLR4 Promotes B Cell Maturation and Is Inhibited by TLR2 / E.A. Hayashi, S. Akira, A. Nobrega // *Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – P. 6639-6647.

110. Heikkila, T.I. Species-specific serodiagnosis of Lyme arthritis and neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii* by using decorin binding protein A / T.I. Heikkila, S.H. Saxen, J. Panelius, H. Yrjanainen, P. Lahdenne // *J. Clin. Microbiol.* - 2002. – Vol. 40. – P. 453–460.

111. Hewetson, R.W. The inheritance of resistance by cattle to cattle tick // *Aust. Vet. J.* – 1972. - Vol. 48. – P. 299–303.

112. Higgs, G.A. Prostaglandins in the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina, Ixodidae) / G.A. Higgs, J.R. Vane, R.J. Hart, C. Porter, R.G. Wilson // *Bull. Ent. Res.* – 1976. - Vol. 66. – P. 665–670.

113. Hirschfeld, M. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2 / M. Hirschfeld, C.J. Kirschning, R. Schwandner, H. Wesche, J.H. Weis, R.M. Wooten, J.J. Weis // *J. Immunol.* – 1999. - Vol. 163. - P. 2382-2386.

114. Hojgaard, A. Molecular Identification of Salp 15, a Key Salivary Gland Protein in the Transmission of Lyme Disease Spirochetes, From *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) / A. Hojgaard, S.F. Biketov, A.V. Shtannikov, N.S. Zeidner, J. Piesman // J. Med. Entomol. - 2009. - Vol. 46(6). - P. 1458-1463.

115. Hovius, J.W.R. Salivating for knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva / J.W.R. Hovius, M. Levi, E. Fikrig // PLoS Medicine. – 2008. - Vol. 5. - issue 2: e43. - P. 0202-0208.

116. Hovius, J.W.R. Preferential Protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 Homologue in *Ixodes ricinus* Saliva / J.W.R. Hovius, T.J. Schuijt, K.A. Groot, J.J. Roelofs, G.A. Oei, J.A. Marquart, R.de Beer, C. van 't Veer, T. van der Poll, N. Ramamoorthi, E. Fikrig, A.P. van Dam // J. Infect. Diseases. – 2008. - Vol. 198. - P 91-108.

117. Hovius, J.W.R. Identification of Salp15 Homologues in *Ixodes ricinus* Ticks / J.W.R. Hovius, N. Ramamoorthi, C. Van't Veer, K.A. de Groot, A.M. Nijhof, F. Jongejan, A.P. Van Dam, E. Fikrig // Vector-borne and zoonotic diseases. - 2007. - Vol. 7(3). – P. 296-303.

118. Hovius, J.W.R. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits dendritic cell function by impairing nucleosome remodeling and decreasing mRNA stability of pro-inflammatory cytokines / J.W.R. Hovius, M.A. de Jong, J. den Dunnen, M. Litjens, E. Fikrig, T. van der Poll, S.I. Gringhuis, T.B.H. Geijtenbeek // PLoS Pathog. – 2008. - Vol. 4. - issue 2: e31. doi:10.1371/journal.ppat.0040031.

119. Jauris-Heipke, S. Osp17, a novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: recombinant expression in *Escherichia coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme borreliosis / S. Jauris-Heipke, B. Rossle, G. Wanner, C. Habermann, D. Rossler, V. Fingerle, G. Lehnert, R. Lobentanzer, I. Pradel, B. Hillenbrand, U.Schulte-Spechtel, B. Wilske // Med. Microbiol. Immunol. (Berlin) - 1999. - Vol. 187. – P. 213–219.

120. Jauris-Heipke, S. Genetic heterogeneity of the genes coding for the outer surface protein C (OspC) and the flagellin of *Borrelia burgdorferi* / S. Jauris-Heipke,

R. Fuchs, M. Motz, V. Preac-Mursic, E. Schwab, E. Soutschek, G. Will, B. Wilske // *Med. Microbiol. Immunol. (Berlin)*. - 1993. - Vol. 182. – P. 37–50.

121. Jaworski, D.C. Tick (Acari: Ixodidae) attachment cement and salivary gland cells contain similar immunoreactive polypeptides / D.C. Jaworski, R. Rossell, L.B. Coons, G.R. Needman // *J. Med. Entomol.* - 1992. - Vol. 29(3). - P. 305-309.

122. Jones, L.D. The effect of host resistance to tick infestation on the transmission of Thogoto virus by ticks / L.D. Jones, P.A Nuttall // *J. General. Virol.* – 1990. - Vol. 71. – P. 1039–1043.

123. Julius, D. Molecular mechanisms of nociception / D. Julius, A.I. Basbaum // *Nature*. – 2001. - Vol. 413. – P. 203–210.

124. Juncadella, I.J. T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15 / I.J. Juncadella, R. Garg, S.K. Ananthnarayanan, C.M. Yengo, J. Anguita // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2007. - Vol. 49. – P. 433–438.

125. Kazimirova, M. Pharmacologically active compounds in tick salivary glands // *Adv. Arachnol. Dev. Biol.* - 2008. - Vol. 12. - P. 281-296.

126. Kemp, D.H. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system / D.H. Kemp, R.D. Pearson, J.M. Gough, P. Willadsen // *Exp. Appl. Acarol.* - 1989. - Vol.7(1). - P. 43-58.

127. Klempner, M.S. Invasion of Human skin fibroblasts by the Lyme Disease spirochete, *Borrelia burgdorferi* / M.S. Klempner, R. Noring, R.A. Rogers // *J. Infect. Dis.* - 1993. - Vol. 167 (5). - P. 1074-1081.

128. Konik, P. Anti-tumour necrosis factor-alpha activity in *Ixodes ricinus* saliva / P. Konik, V. Slavikova, J. Salat, J. Reznickova, E. Dvorožnakova, J. Kopecky // *Parasit. Immunol.* – 2006. - Vol. 28. – P. 649–656.

129. Konnai, S. Molecular identification and expression analysis of lipocalins from blood feeding taiga tick, *Ixodes persulcatus* Schulze / S. Konnai, H. Nishikado,

S. Yamada, S. Imamura, T. Ito, M. Onuma, S. Murata, K. Ohashi // *Experimental Parasitology*. – 2011. – Vol. 127. – P. 467 - 474.

130. Kotsyfakis, M. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis* / M. Kotsyfakis, A. Sa-Nunes, I.M. Francischetti, T.N. Mather, J.F. Andersen, J.M.C. Ribeiro // *J. Biol. Chem.* – 2006. - Vol. 281. – P. 26298-26307.

131. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. - Vol. 227. – P. 680-685.

132. Larregina, A.T. Changing paradigms in cutaneous immunology: adapting with dendritic cells / A.T. Larregina, Falo L.D // *J. Invest. Dermatol.* – 2005. - Vol. 124. – P. 1–12.

133. Leboulle, G. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks / M. Crippa, Y. Decrem, N. Mejri, M. Brossard, A. Bollen, E. Godfroid // *J. Biol. Chem.* – 2002. - Vol. 277. – P. 10083-10089.

134. Liang, F.T. An immunodominant conserved region within the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi* / F.T. Liang, A.L. Alvarez, Y. Gu, J.M. Nowling, R. Ramamoorthy, M.T. Philipp // *J. Immunol.* - 1999. - Vol. 163. – P. 5566–5573.

135. Lin, T. Central role of the Holliday junction helicase RuvAB in vlsE recombination and infectivity of *Borrelia burgdorferi* / T. Lin, L. Gao, D.G. Edmondson, M.B. Jacobs, M.T. Philipp, S.J. Norris // *PLoS Pathog.* - 2009. - Vol. 5(12): e1000679. doi:10.1371/ journal.ppat.1000679.

136. Mans, B.J. Disaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae) / B.J. Mans, J. Coetzee, A.I. Louw, A.R. Gaspar, A.W. Neitz // *Exp. Appl. Acarol.* – 2000. - Vol. 24. – P. 271–282.

137. Mans, B.J. Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae) / B.J. Mans, A.R. Gaspar, A.I. Louw, A.W. Neitz // *Exp. Appl. Acarol.* – 1998. - Vol. 22. – P. 353–366.

138. Maxwell, S.S. Tick modulation of the in-vitro expression of adhesion molecules by skin-derived endothelial cells / S.S. Maxwell, T.A. Stoklasek, Y. Dash, K.R. Macaluso, S.K. Wikel // *Ann. Trop. Med. Parasitol.* – 2005. - Vol. 99. - P. 661–672.

139. McTier, T.L. Resistance and cross-resistance of guinea pigs to *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis*, *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* / T.L. McTier, J.E. George, S.N. Bennet // *J. Parasitol.* - 1981. - Vol. 67(6). - P. 813-822.

140. Mejri, N. Immunosuppressive effects of *Ixodes ricinus* tick saliva or salivary gland extract on innate and acquired immune response of BALB/c mice / N. Mejri, B. Rutti, M. Brossard // *Parasitol. Research.* – 2001. - Vol. 88(3).- P. 192-197.

141. Miranpuri, G.S. Relationship between the resistance of crossbred cattle to ticks *Boophilus microplus* and *Hyalomma anatolicum* // *Vet. Parasitol.* - 1989. - Vol. 31(3). - P. 289-301.

142. Mishaeva, N.P. Protection of vertebrates from experimental tickborne encephalitis in active and passive immunization against *Ixodes* antigens // *Vop. Virusol.* – 1990. - Vol. 8. – P. 93–98.

143. Moniuszko, A. The role of dendritic cells in the pathogenesis of Lyme disease / A. Moniuszko, P. Penza, P. Czupryna, S. Pancewicz, J. Zajkowska // *Centr. Eur. J. Immunol.* – 2013. - Vol. 38, № 4. - P. 569-577.

144. Monteiro, R.Q. Ixolaris: A factor Xa heparin binding exosite inhibitor / R.Q. Monteiro, A.R. Rezaie, J.M. Ribeiro, I.M. Francischetti // *Biochem. J.* - 2005. - Vol. 387(Pt 3). - P. 871-877.

145. Montgomery, R.R. Entry of *Borrelia burgdorferi* into macrophages is end-on and leads to degradation in lysosomes / R.R. Montgomery, S.E. Malawista // *Infect. Immunol.* - 1996. - Vol. 64. - P. 2867-2872.

146. Narasimhan, S. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis* / S. Narasimhan, R.A. Koski, B. Beaulieu, J.F. Anderson, N. Ramamoorthi, F. Kantor, M. Cappello, E. Fikrig // *Insect. Mol. Biol.* – 2002. - Vol. 11. – P. 641–650.

147. Nithiuthai, S. Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea-pigs / S. Nithiuthai, J.R. Allen // *Immunol.* – 1985. - Vol. 55. – P. 157–163.

148. Nunn, M.A. Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata* / M.A. Nunn, A. Sharma, G.C. Paesen, S. Adamson, O. Lissina, A.C. Willis, P.A. Nuttall // *J. Immunol.* – 2005. - Vol. 174. – P. 2084–2091.

149. Nuttall, P.A. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases / P.A. Nuttall, A.R. Trimmell, M. Kazimirova, M. Labuda // *Parasit. Immunol.* – 2006. - Vol. 28. – P. 155–163.

150. Ohnishi, J. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks / J. Ohnishi, J. Piesman, A.M. de Silva // *PNAS.* – 2001. - Vol. 98. – P. 670-675.

151. Oliveira, C.J. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets / C.J. Oliveira, W.A. Carvalho, G.R. Garcia, F.R. Gutierrez, I.K. de Miranda Santos, J.S. Silva // *Vet. Parasitol.* - 2010. - Vol. 167. – P. 288-297.

152. Oliveira, C.J. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 alpha and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5 / C.J. Oliveira, K.A. Cavassani, D.D. More, G.P. Garlet, J.C. Aliberti, J.S. Silva, B.R. Ferreira // *Int. J. Parasitol.* - 2008. - Vol. 38. – P. 705-716.

153. Olson, C.M. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Controls NF- κ B Transcriptional Activation and Tumor Necrosis Factor Alpha Production through RelA Phosphorylation Mediated by Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 1 in Response to *Borrelia burgdorferi* Antigens / C.M. Olson, M.N. Hedrick, H. Izadi, C.B. Tonya, E.R. Olivera, J. Anguita // *Infection and immun.* – 2007. - Vol. 75(1). - P. 270 – 277.

154. Paesen, G.C. Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity / G.C. Paesen, P.L. Adams, P.A. Nuttall, D.L. Stuart // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. - Vol. 1482. – P. 92–101.

155. Pal, U. Tick interactions In *Borrelia*: molecular biology, host interaction and pathogenesis / U. Pal, E. Fikrig, D.S Samuels, J.D. Radolf, eds. UK: Caister Academic Press, Norfolk; 2010. - P. 279–298.

156. Picken, R.N. Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015 / R.N. Picken, Y. Cheng, F. Strle, M.M. Picken // *J. Infect. Dis.* - 1996. - Vol. 174. – P. 1112-1115.

157. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia / S. Poole, B.B. Lorenzetti, J.M. Cunha, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. - Vol. 126. – P. 649–656.

158. Prevot, P.P. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin / P. P. Prevot, B. Couvreur, V. Denis, M. Brossard, L. Vanhammea, E. Godfroid // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25. – P. 3284 – 3292.

159. Probert, W.S. Identification of a 47 kDa fibrinonectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31 / W.S. Probert, B.J. Johnson // *Mol. Microbiol.* - 1998. - Vol. 30. – P. 1003-1015.

160. Ramachandra, R.N. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production / R.N. Ramachandra, S.K. Wikel // *J. Med. Entomol.* – 1992. - Vol. 29. – P. 818–826.

161. Ramamoorthi, N. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host / N. Ramamoorthi, S. Narasimhan, U. Pal, F. Bao, X.F. Yang, D. Fish, J. Anguita, M.V. Norgard, F.S. Kantor, J.F. Anderson, R.A. Koski, E. Fikrig // *Nature.* – 2005. - Vol. 436. – P. 573-577.

162. Rechav, Y. Resistance and cross-resistance of guinea pigs and rabbits to immature stage of ixodid ticks / Y. Rechav, A. Heller-Haupt, M.G.R. Varma // *Med. Vet. Entomol.* - 1989. - Vol. 3(4). - P.333-336.

163. Ribeiro, J.M. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks / J.M. Ribeiro, F. Alarcon-Chaidez, I.M. Francischetti, B.J. Mans,

T.N. Mather, J.G. Valenzuela, S.K. Wikel // *Insect. Biochem. Mol. Biol.* – 2006. - Vol. 36. - P. 111–129.

164. Ribeiro J.M., Endris T. M., Endris R. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities / J.M. Ribeiro, T.M. Endris, R. Endris // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1991. - Vol. 100. – P. 109–112.

165. Ribeiro, J.M. *Amblyomma americanum*: Characterization of salivary prostaglandins E2 and F2alpha by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry / J.M. Ribeiro, P.M. Evans, J.L. MacSwain, J. Sauer // *Exp. Parasitol.* – 1992. - Vol. 74. - P. 112–116.

166. Ribeiro, J.M. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini* / J.M. Ribeiro, G. Makoul, J. Levine, D. Robinson, A. Spielman // *J. Exp. Med.* – 1985. - Vol. 161. – P. 332–344.

167. Ribeiro, J.M. *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion / J.M. Ribeiro, G.T. Makoul, D.R. Robinson // *J. Parasitol.* – 1988. - Vol. 74. – P. 1068–1069.

168. Ribeiro, J.M. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase / J.M. Ribeiro, T.N. Mather // *Exp. Parasitol.* – 1998. - Vol. 89. – P. 213–221.

169. Ribeiro, J.M., *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity / J.M. Ribeiro, A. Spielman // *Exp. Parasitol.* – 1986. - Vol. 62. – P. 292–297.

170. Rittig, M.G. *Borrelia burgdorferi*-induced ultrastructural alterations in human phagocytes: a clue to pathogenicity? / M.G. Rittig, T. Häupl, A. Krause, M. Kressel, P. Groscurth, G.R. Burmester // *J. Pathol.* - 1994. - Vol. 173. – P. 269-282.

171. Roberts, J.A. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle J.A. Roberts, J.D. Kerr // *J. Parasitol.* - 1976. - Vol. 62(4). - P. 485-488.

172. Roversi, P. The structure of OMCI, a novel lipocalin inhibitor of the complement system / P. Roversi, O. Lissina, S. Johnson, N. Ahmat, G.C. Paesen, K. Ploss, W. Boland, M.A. Nunn, S.M. Lea // *J. Mol. Biol.* – 2007. - Vol. 369. - P.784-793.

173. Sangamnatdej, S. A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva / S. Sangamnatdej, G.C. Paesen, M. Slovak, P.A. Nuttall // *Insect. Mol. Biol.* – 2002. - Vol. 11. – P. 79–86.

174. Sa-Nunes, A. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva / A. Sa-Nunes, A. Bafica, D.A. Lucas, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, J.F. Andersen, T.N. Mather, J.M. Ribeiro, I.M. Francischetti // *J. Immunol.* – 2007. - Vol. 179. – P. 1497–1505.

175. Schoeler, G.B. *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/ HeN mice / G.B. Schoeler, S.A. Manweiler, S.K. Wikel // *Exp. Parasitol.* – 1999. - Vol. 92. – P. 239–248.

176. Schoeler, G.B. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods / G.B. Schoeler, S.K. Wikel // *Annals of Trop. Med. Parasitol.* - 2001. - Vol. 95. – P. 755–771.

177. Schorderet, S. Effects of human recombinant interleukin-2 on the resistance, and on the humoral and cellular response of rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* ticks / S. Schorderet, M. Brossard // *Vet. Parasitol.* - 1994. - Vol. 54. – P. 375–387.

178. Schröder, N.W. Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids / N.W. Schröder, J. Eckert, G. Stübs, R.R. Schumann // *Immunobiol.* – 2008. - Vol. 213. - Issues 3-4. - P. 329-340.

179. Schroeder, H. The paralogous salivary anticomplement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species / H. Schroeder, V. Daix, L. Gillet, J.C. Renauld, A. Vanderplasschen // *Microb. Infect.* – 2007. - Vol. 9. – P. 247–250.

180. Schulte-Spechtel, U. Molecular analysis of decorin-binding protein A (DbpA) reveals five major groups among European *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains with impact for the development of serological assays and indicates lateral gene

transfer of the dbpA gene / U. Schulte-Spechtel, V. Fingerle, G. Goettner, S. Rogge, B. Wilske // Intern. J. Med. Microbiol. – 2006. – Vol. 296. – Suppl. 1. – P. 250-266

181. Schwan, T.G. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice / T.G. Schwan, J. Piesman // J. Clin. Microbiol. – 2000. - Vol. 38. - P. 382–388.

182. Singh, S.K. Tick–host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases / S.K. Singh, H.J. Girschick // Curr. sci. – 2003. - Vol. 85, N 9. - P. 1284-1298.

183. Skare, J.T. Gene regulation, transcriptomics and proteomics. In *Borrelia: molecular biology, host interaction and pathogenesis* / Samuels D. S., Radolf J. D., eds. UK: Caister Academic Press, Norfolk, 2010. - P. 67–101.

184. Suhonen, J. *Borrelia burgdorferi*-Induced Oxidative Burst, Calcium Mobilization, and Phagocytosis of Human Neutrophils Are Complement Dependent / J. Suhonen, K. Hartiala, H. Tuominen-Gustafsson, M.K. Viljanen // J. Infect. Dis. - 2000. - Vol. 181. - P. 195-202.

185. Tellam, R.L. Vaccination against ticks / Young W. K., ed. In: *Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press; 1992. – P. 303– 331.

186. Titus, R.G. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission / R.G. Titus, J.V. Bishop, J.S. Mejia // Parasit. Immunol. – 2006. – Vol. 28. – P. 131–141.

187. Tracey-Patte, P.D. *Boophilus microplus*: passage of bovine immunoglobulins and albumin across the gut of cattle ticks feeding on normal or vaccinated cattle / P.D. Tracey-Patte, D.H. Kemp, L.A.Y. Johnson // Res. Vet. Sci. - 1987. - Vol. 43(3). - P. 287-290.

188. Trager, W. Acquired immunity to ticks // J. Parasitology. - 1939. - Vol. 25(1). - P. 57-81.

189. Trimnell, A.R. Dual action ectoparasite vaccine targeting ‘exposed’ and ‘concealed’ antigens / A.R. Trimnell, R.S. Hails, P.A. Nuttall // *Vaccine*. – 2002. - Vol. 20. - P. 3560–3568.

190. Tyson, K. Biochemical and functional characterization of Salp20, an ixodes scapularis tick salivary protein that inhibits the complement pathway / K. Tyson, C. Elkins, H. Patterson, E. Fikrig, A. de Silva // *Insect. Mol. Biol.* – 2007. - Vol. 16. – P. 469–479.

191. Valentine-Thon, E. A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA) – for Lyme borreliosis / E. Valentine-Thon, K. Ilsemann, M. Sandkamp // *Diagnostic Microbiol. and Infect. Disease*. - 2007. - Vol. 57, Issue 1. - P. 27-34.

192. Valenzuela, J.G. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis* / J.G. Valenzuela, R. Charlab, T.N. Mather, J.M. Ribeiro // *J. Biol. Chem.* – 2000. - Vol. 275. - P. 18717–18723.

193. Valenzuela, J.G. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis* / J.G. Valenzuela, I.M. Francischetti, V.M. Pham, M.K. Garfield, T.N. Mather, J.M. Ribeiro // *J. Exp. Biol.* - 2002. - Vol. 205. - P. 2843-2864.

194. Van Dam, A.P. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestation of Lyme borreliosis / A.P. Van Dam, H. Kuiper, K. Vos, A. Widjojokusumo, B.M. de Jongh, L. Spanjaard, A.C. Ramselaar, M.D. Kramer, J. Dankert // *Clin. Infect. Dis.* - 1993. - Vol. 17. – P. 708-717.

195. Vancova, I. Antichemokine activities of ixodid ticks depend in tick species developmental stage, and duration of feeding / I. Vancova, V. Hajnicka, M. Slovak, P.A. Nuttall // *Vet. Parasitol.* – 2010. - Vol. 167. – P. 274-278.

196. Vancova, I. Differential anti-chemokine activity of *Amblyomma variegatum* adult ticks during blood-feeding / I. Vancova, M. Slovak, V. Hajnicka, M. Labuda, L. Simo, K. Peterkova, R.S. Hails, P.A. Nuttall // *Parasit. Immunol.* – 2007. - Vol. 29. – P. 169–177.

197. Voss-McCowan, M.E. Changes in the digestive tract of female *Amblyomma americanum* as a consequence of feeding upon host expressing different levels of

acquired anti-tick resistance / M.E. Voss-McCowan, S.K. Wikel // First Intern. conf. on tick-borne pathogens at the host-vector interface. Saint Paul (Minnesota). - 1992. - P. 252-258.

198. Wang, G. Impaired host defense to infection and Toll-like receptor 2-independent killing of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates in TLR2-deficient C3H/HeJ mice / G. Wang, Y. Ma, A. Buyuk, S. McClain, J.J. Weis, I. Schwarz // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. - Vol. 231(2). – P. 219–225.

199. Wang, G. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. Nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M 19) / G. Wang, A.P. Van Dam, A. Le Fleche, D. Postic, O. Peter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard, J. Dankert // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1997. - Vol. 47. – P. 926-932.

200. Wang, H. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite / H. Wang, P.A. Nuttall // Cell Mol. Life Sci. – 1999. - Vol. 56. – P. 286–295.

201. Wang, X. Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis* / X. Wang, D.B. Taylor, S.E. Stevens, T.K. Gartner // J. Biol. Chem. 1996. - Vol. 271. – P. 17785–17790.

202. Wikel, S.K. Host immunity to ticks // Ann. Rev. Entomol. 1996. - Vol.41. - P. 1-22.

203. Wikel, S.K. Tick modulation of host cytokines // Exp. Parasitol. - 1996. – Vol. 84. – P. 304–309.

204. Wikel, S.K. Tick modulation of host immunity: An important factor in pathogen transmission // Intern. J. Parasitol. - 1999. - Vol. 29. – P. 851–859.

205. Wikel, S.K. Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance / S.K. Wikel, J.R. Allen // Immunol. – 1976. - Vol. 30. – P. 311–316.

206. Wikel, S.K. Acquired resistance to ticks: IV. Skin reactivity and in vitro lymphocyte responsiveness to salivary gland antigen / S.K. Wikel, J.E. Graham, J.R. Allen // Immunol. - 1978. - Vol. 34. – P. 257–263.

207. Wikel, S.K. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks / S.K. Wikel, R.N. Ramachandra, D.K. Bergman, T.R. Burkot, J. Piesman // *Infect. Immunol.* – 1997. - Vol. 65. – P. 335–338.
208. Willadsen, P. Immunity to ticks // *Adv. Parasitol.* - 1980. - Vol. 18. - P. 293-313.
209. Willadsen, P. Novel vaccines for ectoparasites // *Vet. Parasitol.* – 1997. - Vol. 71. – P. 209–222.
210. Willadsen, P. Immunological control of ectoparasites: past achievements and future research priorities // *Genet. Anal.* – 1999. - Vol. 15. – P. 131–137.
211. Willadsen, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. // *Vet. Parasitol.* – 2001. - Vol. 101. – P. 353–368.
212. Willadsen, P. Tick control: Thoughts on a research agenda // *Vet. Parasitol.* – 2006. - Vol. 138. – P. 161–216.
213. Willadsen, P. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases / P. Willadsen, F. Jongejan // *Parasitol. Today.* - 1999. - Vol. 15. - P. 258-262.
214. Willadsen, P. Vaccination with "concealed" antigens for tick control / P. Willadsen, D.H. Kemp // *Parasitol. Today.* - 1988. - Vol. 4(3). - P. 196-198.
215. Wooten, R.M. Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi* / R.M. Wooten, Y. Ma, R.A. Yoder, J.P. Brown, J.H. Weis, J.F. Zachary, C.J. Kirschning, J.J. Weis // *J. Immunol.* – 2002. - Vol. 168. – P. 348–355.
216. Worms, M. J. Requirement for host Fc receptors and IgG antibodies in host immune responses against *Rhipicephalus appendiculatus* / M.J. Worms, P.W. Askenase, S.J. Brown // *Vet. Parasitol.* - 1998. - Vol. 28(2). - P. 153-161
217. Yang, X. Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent *Borrelia burgdorferi* / X. Yang, M.S. Goldberg,

T.G. Popova, G.B. Schoeler, S.K. Wikel, K.E. Hagman, M.V. Norgard // *Mol. Microbiol.* - 2000. - Vol. 37. - P. 1470-1479.

218. Yin, Z. T cell cytokine pattern in the joints of patients with Lyme arthritis and its regulation by cytokines and anticytokines / Z. Yin, J. Braun, L. Neure, P. Wu, U. Eggens, A. Krause, T. Kamradt, J. Sieper // *Arthritis Rheum.* - 1997. - Vol.40 (issue 1). – P. 69-79.

219. Yu, D. A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum* / D. Yu, J. Liang, H. Yu, H. Wu, C. Xu, J. Liu, R. Lai // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. - Vol. 343. – P. 585-590.

220. Zeidner, N. Suppression of acute *Ixodes scapularis*-induced *Borrelia burgdorferi* infection using tumor necrosis factor-alpha, Interleukin-2 and Interferon-gamma / N. Zeidner, M. Dreitz, D. Belasco, D. Fish // *J. Infect. Dis.* – 1996. - Vol. 173. – P. 187–195.

221. Zhang, J.R. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes / J.R. Zhang, J.M. Hardham, A.G. Barbour, S.J. Norris // *Cell.* - 1997. - Vol. 89. – P. 275–285.

222. Zeidner, N. Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: induction of a Th2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice / N. Zeidner, M.L. Mbow, M. Dolan, R. Massung, E. Baca, J. Piesman // *Infect. Immunol.* – 1997. - Vol. 65. – P. 3100–3106.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ 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 мышиную 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) тезисы докладов:

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 *Borrellii 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. 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., профессора Дятлова И. А., за предоставленную возможность выполнения данной диссертационной работы.