DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-31-38

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 31–38
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 31–38

Сравнительная оценка токсичности и иммуногенности панели рекомбинантных белков бруцелл *in vivo*

В.И.Дятлова, Т.В.Гапельченкова, В.А.Казаков, С.В.Дентовская

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

Рост заболеваемости бруцеллезом среди населения диктует необходимость совершенствования мер специфической профилактики. Создание безопасной и эффективной противобруцеллезной вакцины для человека остается актуальной задачей глобальной биомедицины. Современные подходы, основанные на достижениях геномики, протеомики и биоинформатики, успешно применяются для разработки профилактических средств нового поколения.
В настоящем исследовании проведена доклиническая оценка безопасности и иммуногенности 40 рекомбинантных белков-кандидатов в противобруцеллезные вакцины, полученных с использованием инновационных технологий. Скрининг выполняли на мышах линии BALB/c методами гистологического, биохимического, гематологического и иммуноферментного (ИФА) анализов.
По результатам ИФА все антигены индуцировали выраженный специфический иммунный ответ. На основании комплексного анализа параметров безопасности и иммуногенности отобраны 35 белков, перспективных для дальнейших испытаний протективной эффективности.
Ключевые слова: бруцеллез, белки, токсичность, гистология, мыши, антитела

Для цитирования: Дятлова В.И., Гапельченкова Т.В., Казаков В.А., Дентовская С.В. Сравнительная оценка токсичности и иммуногенности панели рекомбинантных белков бруцелл *in vivo*. Бактериология. 2026; 11(3): 31–38. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-31-38

Comparative in vivo evaluation of toxicity and immunogenicity of a panel of recombinant brucella proteins

V.I.Dyatlova, T.V.Gapelchenkova, V.A.Kazakov, S.V.Dentovskaya

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation

The rising incidence of brucellosis among the population underscores the urgent need to improve specific prevention measures. Developing a safe and effective human brucellosis vaccine remains a critical challenge in global biomedicine. Advanced approaches in genomics, proteomics, and bioinformatics are successfully utilized to design next-generation prophylactic agents. This study presents a preclinical evaluation of the safety and immunogenicity of 40 recombinant protein candidates for brucellosis vaccines, developed using innovative technologies. Screening was performed on BALB/c mice using histological, biochemical, hematological, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods. According to the ELISA results, all antigens induced a robust specific immune response. Based on a comprehensive safety and immunogenicity analysis, 35 promising proteins were selected for further protective efficacy trials.
Key words: brucellosis, proteins, toxicity, histology, mice, antibodies

For citation: Dyatlova V.I., Gapelchenkova T.V., Kazakov V.A., Dentovskaya S.V. Comparative in vivo evaluation of toxicity and immunogenicity of a panel of recombinant brucella proteins. Bacteriology. 2026; 11(3): 31–38. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-31-38

Для корреспонденции:

Дятлова Варвара Ивановна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: dyatlovav@obolensk.org

Статья поступила 15.06.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Varvara I. Dyatlova, PhD, MD, Senior Researcher, Plague Microbiology Laboratory, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 “Quarter A” Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: dyatlovav@obolensk.org

The article was received 15.06.2026, accepted for publication 30.09.2026

© Издательство «Династия», 2026
Тел./факс: +7 (495) 660-6004, e-mail: red@phdynasty.ru, www.phdynasty.ru

Согласно актуальным эпидемиологическим данным, ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации за последние четыре года оценивается как неустойчивая с тенденцией к росту заболеваемости. Увеличение числа случаев инфекции среди населения происходит на фоне стабильно высокой энзоотичности по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота в регионах юга Сибири и европейской части страны. Одним из ключевых факторов, способствующих формированию новых неблагополучных очагов, является недостаточная эффективность комплекса профилактических мероприятий среди групп риска [1]. В настоящее время плановая вакцинация людей против бруцеллеза проводится исключительно по эпидемическим показаниям, что обусловлено высокой реактогенностью и ограниченной безопасностью применяемых живых вакцин.

Современные подходы к конструированию вакцин с использованием достижений геномики, протеомики и биоинформатики позволяют оперативно разрабатывать и внедрять в производство профилактические препараты, лишенные недостатков традиционных живых вакцин. В рамках настоящего исследования методами компьютерного моделирования и обратной вакцинологии нами были определены, спроектированы и получены рекомбинантные бруцеллезные белки, обладающие высоким вакцинным потенциалом. Наряду с протективностью важнейшей характеристикой любой вакцины является ее экспериментально доказанная безопасность. Биотестирование на модельных животных в стандартизированных условиях является одним из наиболее объективных методов оценки безвредности новых фармакологических препаратов [2]. В ходе таких исследований фиксируются изменения ключевых тест-параметров (внешний вид, поведенческие реакции, выживаемость, плодовитость, масса тела, показатели крови, морфологическое состояние органов) в ответ на введение препарата. Чаще всего в доклинических испытаниях используют лабораторных мышей, что обусловлено их уникальной биологической схожестью с человеком, компактными размерами, экономичностью содержания и высокой скоростью размножения. Ранее на базе нашей лаборатории была разработана модель бруцеллеза на мышах линии BALB/c. Применение данной модели позволило в течение 56 суток комплексно изучить динамику инфекции, включая мониторинг массы тела, патогистологический анализ, оценку бактериальной обсемененности паренхиматозных органов и лабораторные показатели крови [3]. В настоящей работе исследовано влияние 40 рекомбинантных бруцеллезных белков, обладающих вакцинным потенциалом, на здоровых животных. Для обеспечения сопоставимости результатов использовали аналогичную линию мышей и спектр методических подходов для оценки их физиологического статуса.

Целью данной работы являлась оценка иммуногенности и токсичности 40 перспективных рекомбинантных белков бруцелл на мышах линии BALB/c для отбора наиболее безопасных кандидатов для дальнейшего исследования их протективной эффективности.

Материалы и методы

Лабораторные животные. Эксперименты проводили на 164 самках мышей линии BALB/c (H2d) в возрасте 6–8 нед. и массой 15–20 г, полученных из филиала «Апрелевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Содержание животных и уход за ними осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протокол экспериментального исследования одобрен биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ПМБ (протокол № ВП-2024/7 от 06.11.2024). Период наблюдения за животными составил 15 суток.

Рекомбинантные белки. 40 рекомбинантных бруцеллезных белков (таблица) были получены в экспрессионной системе *E. coli* (в штаммах SHuffle T7, BL21(DE3) и BL21(DE3) pLysS, трансформированных плазмидами pACYCduet-1, pET22b, pET24b, pET28b и pET32b с генами целевых белков) под индукцией изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) и селективным давлением антибиотиков (ампициллин, канамицин, хлорамфеникол). Очистку проводили методом металл-хелатной хроматографии в денатурирующих условиях. С целью оптимизации экспрессии, устранения токсических свойств и повышения иммуногенности белков были проведены следующие генетические модификации: замена кодонов в нуклеотидных последовательностях, кодирующих токсичные пептиды в составе нескольких белков (OMP16, OMP31, LptD, rHRA1, rBigB); конструирование слитого гена, состоящего из последовательностей трех бруцеллезных белков (OMP25d-OMP19-OMP10); введение в плазмиду pACYCduet-1 второго бруцеллезного гена для коэкспрессии LptD с шапероном LptE и др.

Иммунизация животных. Животных разделили на 40 опытных групп и 1 контрольную группу (по $n = 4$ в каждой). Мышам опытных групп однократно подкожно вводили исследуемые белки в дозе 20 мкг, адсорбированные на 15 мкг гидроксида алюминия в 200 мкл фосфатно-солевого буфера. Животные контрольной группы оставались интактными.

Эвтаназия и вскрытие лабораторных животных, отбор материала. Через 24 ч и 14 суток после иммунизации по две мыши из каждой группы выводили из эксперимента путем ингаляции CO_2. При вскрытии отбирали органы для гистологического исследования, а также кровь для общего, биохимического и иммунологического анализов. Для получения сыворотки кровь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем центрифугировали (5000 g, 10 мин). Полученную сыворотку переносили в стерильные пробирки, аликвотировали и хранили при -86°C.

Оценка соматического статуса животных. По программе ежедневного клинического мониторинга проводили общий и физикальный осмотр животных. В ходе осмотра оценивали внешний вид, степень упитанности, особенности поведения и наличие признаков болевого синдрома. Контроль динамики массы тела осуществляли путем ежедневного взвешивания.

ИФА. Уровень специфических антител в сыворотках мышей определяли методом непрямого ИФА. Планшеты сенсибилизировали рекомбинантными белками (6 мкг/лунку в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6). Свободные сайты связывания блокировали 1% раствором БСА в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Промывку на всех этапах осуществляли четырехкратно ФСБ с 0,05% Твин-20. Исследуемые и контрольные сыворотки титровали от 1:100

Таблица. **Оценка токсичности и иммуногенности рекомбинантных белков**
Table. ***Assessment of toxicity and immunogenicity of recombinant proteins***

Белки	Прирост веса, г.	Биохимия		Гистология		P	Титры антител (1:x)		
		2-е сутки	14-е сутки	2-е сутки	14-е сутки		IgGAM	IgG1	IgG2a
BtaF	1,7	glu↓	glob↓ast↑glu↓	CM	–	5	200	400	100
OmpA	2	bun↑glu↓	–	–	–	2	400	400	3200
FliC	-0,5	–	glob↓ glu↓tc↑	–	–	3	800	3200	400
VirB1	0,85	ast↑	ggt↑ tc↑ glob↓	B	–	5	100	200	0
LptE	-0,6	–	glob↓	–	–	3	100	400	100
BtaE	1,4	bun↑	glob↓, tp↓	–	–	3	400	200	100
Omp10	1	ast↑ glu↓	glob↓	MLTA	–	4	100	100	800
rHRA1	1,3	bun↑	ast↑	–	–	2	100	100	1600
TonB	2,5	–	glob↓ tc↑	–	CM	3	200	200	400
VirB5	1,8	glob↓	glob↓	MTA	–	3	100	1600	800
OMP28	1,7	glob↓	–	–	–	1	400	200	400
BAB2_314	2,6	glob↓	–	B, CM	HC	4	100	0	100
L9	1,2	glob↓ tba↑	glob↓ tc↑	–	–	4	100	100	100
Omp25d	1,55	glob↓	ast↑ Cl–↓	–	PMI	4	100	200	0
TolC	0,3	–	glu↓	–	–	1	100	100	100
SP41	1,4	–	tba ↑	–	–	1	0	200	0
rBigB	2,5	glu↓	–	–	–	1	800	800	600
BigB	1,3	ast↑ glu↑	alb↓	LI	–	4	400	800	800
OmpW	3,8	glob↓ bun↑	glob↓	–	–	3	800	100	0
LptD	1	–	–	CM	–	1	800	400	2000
Tig	0,62	–	–	–	–	0	400	3200	800
Omp25c	–0,1	glu↑	–	–	–	1	400	1600	1600
Omp2b	1,8	glu↑	–	–	–	3	400	1600	100
FlgE	1,5	glu↑	–	–	–	1	100	3200	100
Lp	2	glu↑	–	–	–	1	0	100	100
SP29	2,6	glu↑	ldh↑	–	–	3	0	100	0
MliC	1,3		–	–	–	0	100	400	400
LppA	3	glu↑	–	–	–	1	100	100	200
SOD	3,6	glu↑	–	–	–	1	100	200	0
BLS	0,25	–	glob↓glu↑	–	–	2	200	3200	0
L7/L12	1,25	ast↑ glu↑	ldh↑	–	–	4	100	100	0
OmpE	2,45	ast↑bun↑glu↑	ldh↑	–	–	2	400	800	400
Omp19	0,85	ast↑ glu↑	–	–	–	2	400	3200	800
rOMP16	-0,1	alb↓ ast↑	glob↓	MI	–	4	100	800	400
OMP16	-3,2	alb↓ ast↑	glob↓ tba↑	–	B AI	9	100	400	400
VirB8	2,5	ast↑ ldh↑	alt↑ ldh↑	N PMI HS MI	–	7	800	3200	3200
OMP31	-1,15	alb↓alt↑ast↑	glob↓	MNI	B	7	100	100	800
FlgH	1,6	alt↑ast↑ glu↑ bun↑	alb↓glu↑Cl↑ tba↑	B	G	9	0	100	100
IalB	0,25	ast↑alt↑glu↑	Na+↑	AL	EMH G	7	100	400	100
Omp25d- Omp19-Omp10	2,1	alb↓glob↓	–	–	–	2	800	3200	3200

до 1:3200. Специфическое связывание выявляли с помощью козьих антител против IgGAM, IgG1 и IgG2a мыши, меченных пероксидазой хрена (Abclonal, Elabscience, США; 1:5000). В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин (ТМБ; «Хема», Россия); реакцию останавливали 0,5 М H_2SO_4. Оптическую плотность измеряли при 450 нм на спектрофотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия)».

Гематологические исследования. Общий клинический анализ крови выполняли на ветеринарном гематологическом анализаторе BC-5000Vet (Mindray, Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Кровь для исследования отбирали в пробирки, содержащие антикоагулянт К3 ЭДТА.

Биохимические исследования. Биохимический анализ сыворотки крови проводили на автоматическом анализато-

ре vetXpert C5 (Mindray, Китай). Определение более 25 показателей (включая общий белок, активность ферментов и концентрацию электролитов) осуществляли с использованием специализированных диагностических дисков для комплексной экспресс-диагностики от того же производителя.

Гистологические исследования. Образцы печени, селезенки, тимуса и почек иммунизированных мышей фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. После вырезки и промывки в проточной водопроводной воде образцы дегидратировали в батарее этиловых спиртов восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты изучали методом световой микроскопии на микроскопе AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии получали с помощью цифровой камеры высокого разрешения Axiocam 305 color (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.6 lite (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных выполняли в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США) с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Доклиническая оценка безопасности лечебных и профилактических препаратов направлена на выявление нежелательных побочных эффектов до начала клинических испытаний. В настоящей работе изучено токсическое и иммунотропное действие ряда рекомбинантных белков на организм мышей для исключения потенциально опасных кандидатов из дальнейших исследований. Поскольку предварительный теоретический анализ литературы и скрининг *in silico* не обнаружили у целевых белков летальных свойств, возникла необходимость экспериментальной верификации их безопасности на тест-системах *in vivo*. Руководствуясь стандартами ГОСТ 32296-2013, OECD 420, 423 и ОФС.1.1.1.0018.15 [4–7], мы разработали комплексный протокол оценки острой (24 ч) и отсроченной (14 сут.) токсичности при однократном введении мышам двукратной протективной дозы белка (20 мкг) сорбированного на гидроксиде алюминия. Выраженность токсического эффекта оценивали по разработанной балльной шкале. Критериями исключения животных из дальнейшего анализа являлись их гибель или превышение суммарного балла (P) > 6. Изменение каждого показателя оценивалось в 1 балл: снижение массы тела на каждый грамм; гистологические признаки гепато-, сплено-, нефро- или иммунотоксичности; местнораздражающее действие; поведенческие нарушения; гепатоспленомегалия; гиперферментемия; гиперкреатининемия или гипопротеинемия.

Результаты оценки соматического статуса животных

В ходе эксперимента летальных исходов и клинических признаков болевого синдрома у мышей не наблюдалось. На рис. 1 приведена схема изменения массы тела мышей линии BALB/c после иммунизации исследуемыми белками. Динамика массы тела в основном отражала физиологический прирост (0,25–3,8 г). Однако в группах OMP16, OMP31 и LptE зафиксировано статистически значимое снижение веса (-3,2 г, -1,15 г, -0,6 г соответственно). У мышей, иммунизированных OMP19, BLS и rHRA1, наблюдался транзиторный подъем массы тела с последующим снижением, что может быть связано с повышением аппетита или задержкой жидкости, учитывая иммуностимулирующие свойства двух белков [8, 9]. Генетическая детоксикация показала эффективность: нативный BigB вызывал временную потерю веса, тогда как рекомбинантный rBigB – стабильный прирост. Аналогично, нативный OMP16 выраженное снижение массы тела, начиная с 3-х суток, а модифицированный rOMP16 – нет. Снижение веса после 3 суток также отмечено в группе OMP25c. Таким образом, выявлены межгрупповые различия в динамике массы тела животных под влиянием различных белков. Однако ограниченная выборка и нестерильные условия содержания требуют осторожности при интерпретации данных из-за возможного влияния интеркуррентных факторов.

ИФА. Иммунологический анализ сывороток крови мышей выполняли как для оценки иммуногенности вводимых белковых препаратов, так и для подтверждения специфичности индуцированного ими биологического ответа. На 14-е сутки после иммунизации в каждой экспериментальной группе определяли титры суммарных антител трех классов (IgG, IgA, IgM-IgGAM), а также подклассов IgG1 и IgG2a против каждого из 40 антигенов. Соотношение подклассов IgG использовали для оценки направленности иммунного ответа: преобладание IgG2a свидетельствует о клеточном (Th1), а IgG1 – о гуморальном (Th2) компоненте. Результаты ИФА представлены в таблице. Наиболее выраженный суммарный иммунный ответ (IgGAM) зафиксирован к 6 белкам: VirB8, OMP25d-OMP19-OMP10, rBigB, FliC, LptD и OmpW. Клеточный иммунный ответ (по уровню IgG2a) преобладал для 10 антигенов (VirB8, OMP25d-OMP19-OMP10, rBigB, FliC, OMP25c, VirB5, BLS, FlgE, OMP19, OMP2b), тогда как гуморальный (по уровню IgG1) – для 6 (VirB8, OMP25d-OMP19-OMP10, OMP25c, LptD, OMPA, rHRA1). Выявление специфических антител в сыворотках крови опытных животных подтверждает иммуногенность исследуемых рекомбинантных белков и эффективность иммунизации.

Гематологические исследования. Токсические агенты способны оказывать выраженное негативное влияние на систему кроветворения [10]. Гематотоксичность может проявляться как на уровне костного мозга, так и на стадии зрелых клеток, приводя к развитию апластической или гемолитической анемии, нейтропении, агранулоцитоза, тромбоцитопении и коагулопатий. В настоящем исследовании общий анализ крови животных выполняли на 2-е и 14-е сутки после иммунизации белками. Целью данного иследования являлась оценка общего состояния организма, а также обнаружение возможного повреждающего действия исследуемых белков на клеточный состав крови. По результатам гематологического анализа ни в одной из опытных групп не было выявлено статистически значимых изменений количества основных форменных элементов (лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов). Отсутствие сдвигов в лейкоцитарной формуле и стабильность пула клеток периферической крови свидетельствуют об отсутствии прямой гематотоксичности исследуемых белков и индуцированных ими острых патологических процессов в кроветворной системе.

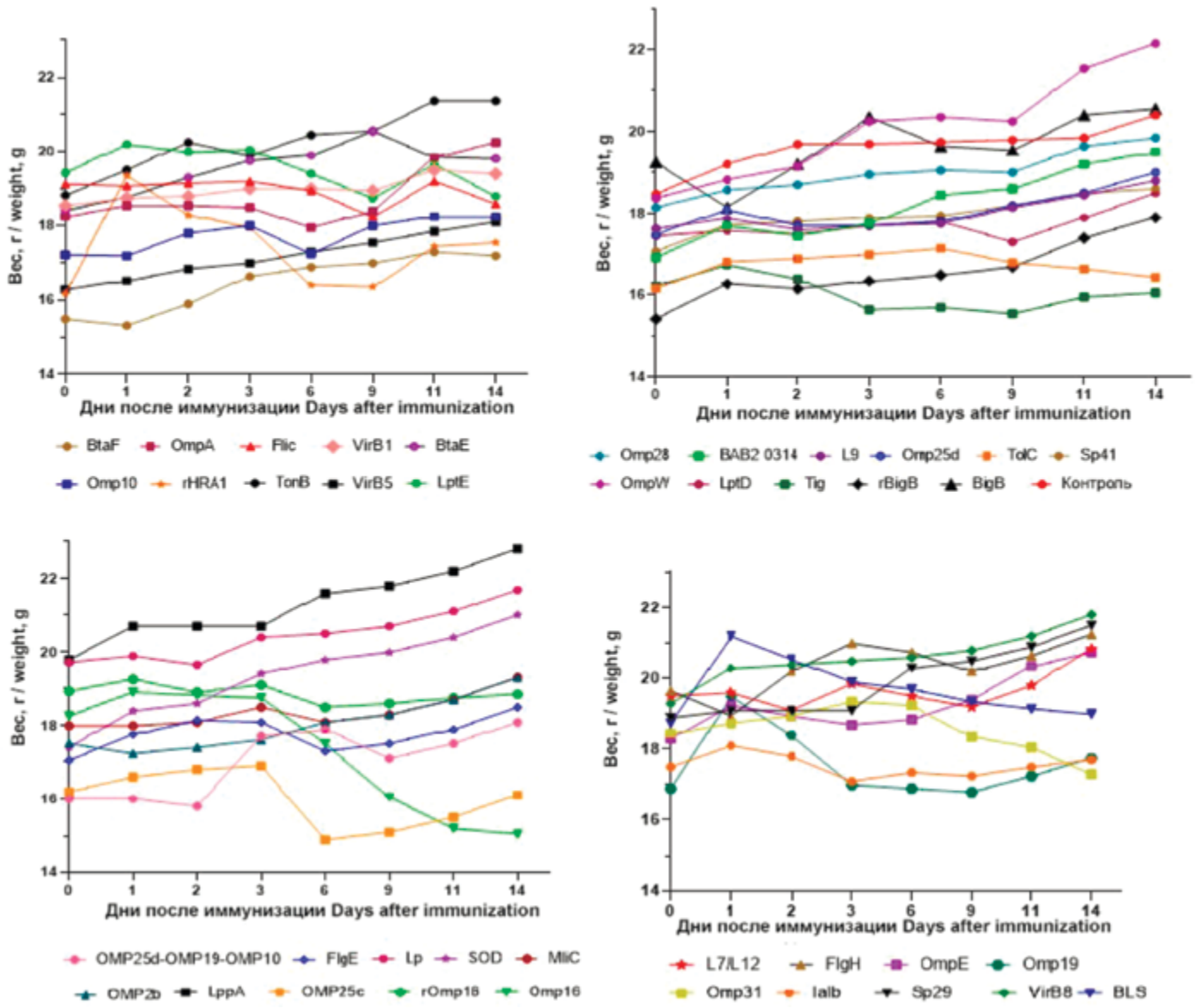

Рис. 1. **Динамика изменения веса мышей после иммунизации рекомбинантными белками.**
Fig. 1. ***Dynamics of changes in the weight of mice after immunization with recombinant proteins.***

Биохимические исследования. Оценка биохимических показателей сыворотки крови позволяет верифицировать латентные и косвенные признаки повреждения внутренних органов при токсической нагрузке [10]. Ключевыми маркерами системной интоксикации традиционно служат следующие патофизиологические сдвиги: гепатотоксичность – индуцированное повреждение паренхимы печени и холестатический синдром, которые регистрируют по гиперферментемии (росту активности аланинаминотрансферазы (alt), аспартатаминотрансферазы (ast), лактатдегидрогеназы (ldh), щелочной фосфатазы (alp), гамма-глутамилтрансферазы (ggt)), а также по уровню общего билирубина, желчных кислот (tba) и холестерина (tc); нефротоксичность – развитие почечной дисфункции, манифестирующее снижением скорости клубочковой фильтрации и ростом концентрации сывороточного креатинина (crea) и мочевины (bun); панкреатотоксичность – поражение ткани поджелудочной железы, критериями которого выступают повышение активности α-амилазы (amy) и глюкозы (glu); метаболические сдвиги-системные нарушения гомеостаза, выражающиеся в увеличении анионного промежутка (разницы между сывороточными катионами и анионами) как маркера метаболического ацидоза, а также в развитии гипопротеинемии (снижение общего белка (tp), альбумина (alb), глобулинов (glob)), отражающей угнетение белковосинтезирующей функции печени. Результаты биохимического анализа представлены в таблице.

В отличие от стабильных гематологических показателей, в биохимическом профиле сыворотки крови у ряда иммунизированных белками групп выявлен комплекс патологических изменений. На вторые сутки раннего постинъекционного периода системная реактивность проявлялась цитолитическим синдромом (ростом активности трансаминаз), что свидетельствовало о транзиторном повышении проницаемости плазматических мембран гепатоцитов. Также зафиксированы холестаз, азотемия и гипергликемия. Последняя развилась вследствие повреждения печени, поджелудочной железы либо как результат контринсулярного ответа гипоталамо-гипофизарной системы на стресс и токсическое воздействие. Сочетанное снижение концентраций альбумина и глобулинов

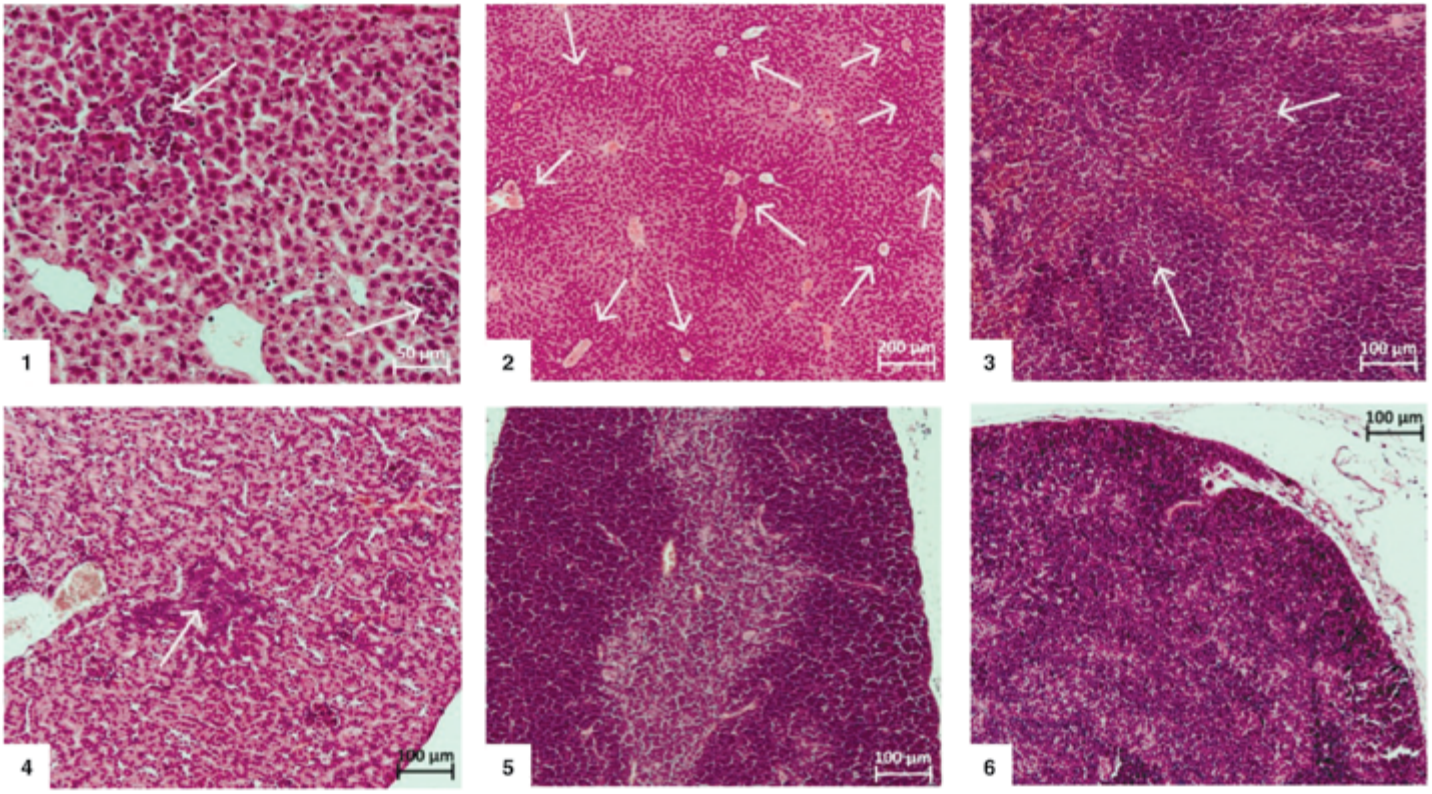

Рис. 2. **Гистологические препараты органов мышей, иммунизированных рекомбинантными белками: 1 – очаги нейтрофильной и макрофагальной инфильтрации в местах некроза гепатоцитов в печени (стрелки), 2 – базофилия гепатоцитов в перипортальных зонах печени (стрелки), 3 – герминативные центры в лимфоидных фолликулах белой пульпы селезенки (стрелки), 4 – очаговая базофилия и мононуклеарная инфильтрация канальцев почек (стрелка), 5 – фрагмент интактного тимуса мыши, 6 – акцидентальная инволюция тимуса. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×100.**

*Fig. 2. **Histological preparations of organs of mice immunized with recombinant proteins: 1 – foci of neutrophilic and macrophage infiltration at the sites of hepatocyte necrosis in the liver (arrows), 2 – basophilia of hepatocytes in the periportal zones of the liver (arrows), 3 – germinal centers in the lymphoid follicles of the white pulp of the spleen (arrows), 4 – focal basophilia and mononuclear infiltration of the renal tubules (arrow), 5 – fragment of the intact mouse thymus, 6 – accidental involution of the thymus. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification ×100.***

в этот период, вероятно, было вызвано интерстициальной экссудацией из-за повышенной проницаемости капилляров, супрессией синтеза альбуминов гепатоцитами и расходом глобулинов на опсонизацию антигена. К 14-м суткам отмечен регресс метаболических нарушений с нормализацией активности трансаминаз и азотистого обмена, что указывает на обратимость процессов и отсутствие стойкой деструкции печени и почек. Сохраняющаяся гипоальбуминемия обусловлена метаболическим переключением гепатоцитов на продукцию белков острой фазы и специфических иммуноглобулинов. Снижение пула свободных глобулинов ассоциировано с их конъюгацией в циркулирующие иммунные комплексы в фазе манифестации гуморального иммунного ответа, что косвенно подтверждается результатами ИФА.

Гистологические исследования. Токсические повреждения внутренних органов выявляются как при макроскопическом осмотре, так и в ходе последующего гистологического анализа. Наиболее чувствительными к воздействию ксенобиотиков оказываются паренхиматозные органы, реагирующие увеличением размеров, а также изменением цвета и тканевой структуры [11]. Острая интоксикация вызывает комплекс патоморфологических изменений. В печени развиваются цитотоксический и холестатический эффекты: нарушение метаболизма и проницаемости мембран гепатоцитов приводит к жировому гепатозу, некрозу клеток и формированию воспалительных очагов с полиморфноклеточной инфильтрацией. Поражение селезенки проявляется гемостазом, отеком, гиперплазией лимфоидных узелков белой пульпы с активацией герминативных центров, а также скоплением сидерофагов в красной пульпе. В почках фиксируют дистрофические изменения, острый канальцевый некроз, интерстициальный нефрит, гломеруло- и артериолопатии. Токсическое воздействие на тимус индуцирует его структурную перестройку, приводящую к развитию вторичного иммунодефицита. При этом на начальном этапе стресс-реакции отмечается транзиторное увеличение органа за счет мобилизации защитных резервов, которое затем сменяется акцидентальной инволюцией с редукцией коркового вещества, падением плотности тимоцитов и разрушением дольчатого строения [12]. Микрофотографии гистологических препаратов, демонстрирующие выраженность описанных патологических изменений у мышей, представлены на рис. 2.

Анализ гистологической картины паренхиматозных и иммунокомпетентных органов животных в динамике выявил четкую стадийность развития токсического процесса, характеризующуюся переходом от острых адаптационно-компенсаторных реакций к деструктивным и органическим изменениям. На 2-е сутки после введения препаратов регистрировались признаки острого стресс-индуцированного и токсического воздействия. В тимусе отмечалась ранняя фаза клеточного ответа, проявляющаяся диффузным слабовыраженным (MLTA) или умеренным (MTA) апоптозом лимфоцитов в

корковом веществе долек при сохранении стабильного кортико-медуллярного отношения. В отдельных случаях фиксировалось транзиторное снижение данного показателя (CM), что свидетельствовало об активной миграции или ускоренной гибели лимфоидных клеток. Со стороны гепатобилиарной системы наблюдалась реактивная перипортальная базофилия гепатоцитов (B), отражающая компенсаторное напряжение белковосинтетической функции печени в ответ на ксеногенную нагрузку. В почечной паренхиме изменения носили преимущественно очаговый характер и ограничивались мелкими периваскулярными мононуклеарными инфильтратами (PMI). К 14-м суткам эксперимента у подопытных животных в ряде случаев отмечалась трансформация острой базофилии ткани печени в очаговый некроз гепатоцитов (N) и декомпенсированную крупнокапельную жировую дистрофию (HS). Прогрессирование воспалительной реакции подтверждалось формированием множественных макрофагально-нейтрофильных (MNI) и мононуклеарных (MI) инфильтратов. В качестве компенсаторного ответа на угнетение магистрального кроветворения в паренхиме печени верифицировались очаги экстрамедуллярного гемопоэза (EMH). В иммунокомпетентных органах к концу второй недели регистрировалась выраженная структурно-функциональная перестройка. В лимфоидных фолликулах белой пульпы селезенки активировались герминативные центры (G), что указывало на протекание интенсивного иммуногенеза. В тимусе регистрировался очаговый апоптоз лимфоцитов со стойким падением кортико-медуллярного отношения (AL), переходящий в акцидентальную инволюцию органа (AI). В мочевыделительной системе развивались признаки деструктивной нефропатии, проявляющиеся в виде экссудации белка с формированием гиалиновых масс в просвете почечных канальцев (HC) и лейкоцитарной инфильтрации лоханок (LI).

На основании комплексного скрининга, включающего интегральную балльную оценку, динамику массы тела, биохимические маркеры и результаты гистопатологического анализа, из дальнейшей разработки были выбракованы 5 рекомбинантных белков, продемонстрировавших высокий уровень токсичности:

OMP16 (9 баллов) вызвал системный токсикоз, истощение, цитолиз и гипоальбуминемию на фоне глубокого иммунотоксического действия с инволюцией тимуса и опустошением его лимфоидной популяции;

FlgH (9 баллов) продемонстрировал полиорганную агрессивность с развитием тяжелого гепаторенального синдрома, проявившегося нефротоксичностью, гипоальбуминемией и гепатотоксичностью с критическим подъемом трансаминаз;

VirB8 (7 баллов) проявил прямую деструктивную гепатотоксичность с массивным энзиматическим взрывом и морфологическими изменениями печени в виде очагового некроза, жировой дистрофии и воспаления;

OMP31 (7 баллов) селективно индуцировал в печени воспаление с макрофагальной и нейтрофильной инфильтрацией, потерей массы тела и падением уровня альбумина;

IalB (7 баллов) был исключен из-за высокой иммуно- и гематотоксичности, выразившейся в апоптозе лимфоцитов тимуса, запуске компенсаторного внекостномозгового кроветворения в печени и реактивной гиперплазии.

Заключение

Таким образом, на основании комплексной оценки безопасности и иммуногенности 40 рекомбинантных белков-кандидатов против бруцеллеза на мышах линии BALB/c для дальнейшего изучения протективной активности был отобран 35 перспективный антиген. Использование белков OMP16, FlgH, VirB8, OMP31 и IalB в составе вакцинных препаратов признано нецелесообразным.

Источники финансирования

Работа выполнена по теме НИОКР М 2.3 в рамках государственного задания.

Funding

The work was carried out on the topic of R & D M 2.3 within the framework of a state assignment

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Работа с животными

Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦПМБ (№ ВП-2024/7 от 06.11.2024).

Animal Work

All animal work was conducted in accordance with GOST 33216-2014 "Guidelines for the Care and Maintenance of Laboratory Animals." The animal experiment protocol was approved by the Bioethics Committee of the State Scientific Center for Preventive Medical Research (No VP-2024/7 dated November 6, 2024).

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Пономаренко ДГ, Матвиенко АД, Хачатурова АА, Жаринова ИВ, Скударева ОН, Транквилевский ДВ, и др. Анализ ситуации по бруцеллезу в мире и Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2024;2:36-50. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-36-50
2. Биотестирование: методические указания по выполнению лабораторных работ. Сост.: Борисова СД. Казань: Казан. гос. энерг. ун-т, 2015.
3. Дятлова ВИ, Гапельченкова ТВ, Казаков ВА, Дентовская СВ. Моделирование бруцеллеза у мышей в условиях лаборатории уровня биологической безопасности 2. Бактериология. 2025;10(4):47-51. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-47-51
4. ГОСТ 32296-2013. Межгосударственный стандарт. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. М., Стандартинформ, 2019.
5. «ОФС.1.1.1.0018. Общая фармакопейная статья. Аномальная токсичность» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 11.04.2025 N 188) («Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание») [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://internet-law.ru/documents/prod/gosudarstvennaya-farmakopeya/0/ofs_1_75262.html?ysclid=mseln33mhi578759234 (дата обращения 04.08.2026).
6. OECD (2002), Test No. 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: 10.1787/9789264070943-en
7. OECD (2002), Test No. 423: Acute Oral toxicity – Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: 10.1787/9789264071001-en
8. Risso GS, Carabajal MV, Bruno LA, Ibañez AE, Coria LM, Pasquevich KA, et al. U-Omp19 from *Brucella abortus* Is a Useful Adjuvant for Vaccine Formulations against *Salmonella* Infection in Mice. Front Immunol. 2017 Feb 17;8:171. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00171
9. Rosas G, Fragoso G, Ainciart N, Esquivel-Guadarrama F, Santana A, Bobes RJ, et al. *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. Microbes Infect. 2006 Apr;8(5):1277-86. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.006
10. Куценко СА. Основы токсикологии: научное издание. СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2004.
11. Егоров АН, Гольдерова АС, Троев ИП. Гистологическая оценка токсичности экстракта *Phlojodicarpus sibiricus* на печень и почки мышей линии ICR. Международный научно-исследовательский журнал. 2024;11(149). DOI: 10.60797/IRJ.2024.149.19
12. Полевщиков АВ, Гурова ОВ, Зассеева МД, Старская ИС, Гусельникова ВВ. Динамика морфологических изменений в тимусе мыши после иммунизации. Тихоокеанский медицинский журнал. 2014;4(58):41-45.

References

1. Ponomarenko DG, Matvienko AD, Khachaturova AA, Zharinova IV, Skudareva ON, Trankvilevsky DV, et al. Analysis of the Situation on Brucellosis around the World and in the Russian Federation. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2024;2:36-50. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-36-50 (In Russian).
2. Biotesting: guidelines for performing laboratory work. Comp.: Borisova SD. Kazan: Kazan State Power Engineering University, 2015. (In Russian).
3. Dyatlova VI, Gapelchenkova TV, Kazakov VA, Dentovskaya SV. Simulation of brucellosis in a mouse model in the biosafety level-2 laboratory. Bacteriology. 2025;10(4):47-51. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-47-51 (In Russian).
4. GOST 32296-2013. Interstate standard. Test methods for the effects of chemical products on the human body. M.: Standartinform, 2019. (In Russian).
5. OFS.1.1.1.0018. General Pharmacopoeia Article. Abnormal Toxicity (approved and put into effect by Order of the Ministry of Health of Russia dated 11.04.2025 N 188) (State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XV edition) [Electronic resource]. Available at: https://internet-law.ru/documents/prod/gosudarstvennaya-farmakopeya/0/ofs_1_75262.html?ysclid=mseln33mhi 578759234 (accessed 04.08.2026). (In Russian).
6. OECD (2002), Test No. 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: 10.1787/9789264070943-en
7. OECD (2002), Test No. 423: Acute Oral toxicity – Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: 10.1787/9789264071001-en
8. Risso GS, Carabajal MV, Bruno LA, Ibañez AE, Coria LM, Pasquevich KA, et al. U-Omp19 from *Brucella abortus* Is a Useful Adjuvant for Vaccine Formulations against *Salmonella* Infection in Mice. Front Immunol. 2017 Feb 17;8:171. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00171
9. Rosas G, Fragoso G, Ainciart N, Esquivel-Guadarrama F, Santana A, Bobes RJ, et al. *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. Microbes Infect. 2006 Apr;8(5):1277-86. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.006
10. Kutsenko SA. Fundamentals of Toxicology: scientific publication. St. Petersburg: OOO Izdatelstvo Foliant, 2004. (In Russian).
11. Egorov AN, Golderova AS, Troev IP. Histological evaluation of the toxicity of *Phlojodicarpus sibiricus* extract on liver and kidney of ICR line mice. International Research Journal. 2024;11(149). DOI: 10.60797/IRJ.2024.149.19. (In Russian).
12. Polevschicov AV, Gurova OV, Zasseeva MD, Starskaya IS, Guselnikova VV. Dynamic of in muscle thymus after immunization. Pacific Medical Journal. 2014;4(58):41-45. (In Russian).

Информация о соавторах:

Гапельченкова Татьяна Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Казаков Виталий Анатольевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Tatiana V. Gapelchenkova, Researcher of the Plague microbiology laboratory of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Vitaly A. Kazakov, MD, PhD, DSc, Leading Researcher of the laboratory for molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, Chief Researcher of Plague Microbiology laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor