

На правах рукописи

Маркина Анна Александровна

**Липополисахаридная кандидат-вакцина для профилактики
эндотоксического и септического шока**

03.03.03 – иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва - 2013

Работа выполнена в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Научный руководитель: Апарин Пётр Геннадьевич
доктор медицинских наук,
зав. лабораторией полисахаридных вакцин
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Официальные оппоненты: Пинегин Борис Владимирович,
доктор медицинских наук, профессор,
зав. отделом иммунодиагностики и иммунокоррекции
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России;

Винницкий Леонид Ильич,
доктор медицинских наук, профессор,
рук. лаборатории иммунологии и регуляторных
механизмов в хирургии ФГБУ
«Российский научный центр хирургии имени
академика Б.В.Петровского» РАМН.

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт вакцин и
сыровоток им. И.И. Мечникова РАМН.

Защита диссертации состоится 25 декабря 2013 г. в 14.00 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.017.01 в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по адресу: 115478, Москва, Каширское шоссе, д.24, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2013 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Г.О. Гудима

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Септический и эндотоксический шок являются чрезвычайно опасными патологическими состояниями, которые возникают на фоне массивного поступления в организм грамотрицательных бактерий и их эндотоксинов (липополисахаридов - ЛПС), вследствие септического (инфекционного) процесса или серьёзных нарушений микроциркуляции, и относятся к числу клинических состояний, в лечении которых не удаётся достичь существенного успеха. В мире ежегодно диагностируется 1,5 млн. случаев сепсиса с частотой один случай на каждую сотню госпитализаций (Wheeler A.P., Bernard G.R., 1999). В России количество септических состояний соответствует частоте проявления сепсиса в ведущих клиниках мира (Рожков А.С. и др., 2005). Несмотря на высокотехнологичные методы лечения, сепсис остаётся патологическим состоянием, ассоциированным с высоким уровнем летальности (до 50%) и занимает первое место по причине смертности пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии не кардиологического профиля (Friedman G. et al., 1998; Linde-Zwirbe W.T. et al., 1999).

Сепсис может развиваться как патологический процесс, сопровождая различные инфекционные заболевания, или проявляться в виде осложнений при травматических повреждениях (ожог, хирургическая операция или открытая рана, множественные травмы механического характера) во время которых эндогенные грамотрицательные бактерии (и их эндотоксины), преодолевая защитные барьеры организма, обуславливают развитие воспалительного процесса (Hubbard W.J., et al., 2005). В основе сепсиса лежит синдром системного воспалительного ответа, который проявляется в генерализованном воспалении на фоне гиперактивации ЛПС клеток, экспрессирующих цитокины и медиаторы воспаления (Савельев В.С., Гельфанд Б.Р., 2006).

Иммунофармакологические интервенции на фоне эндотоксического и септического шока направлены на блокирование на разных уровнях патогенетических событий, ведущих к лавинообразной секреции провоспалительных цитокинов, и их действия. Селективное блокирование TLR4 рецепторов и нейтрализация эндотоксинов грамотрицательных бактерий (Cross A.S., 2010) или провоспалительных цитокинов с помощью различных агентов, оказываются недостаточно эффективными для снижения смертности среди септических больных (Salkowski C.A. et al., 1998; Remick D.G., Ward P.A., 2005).

Неудачи в области терапии сепсиса привлекли особое внимание к изучению иммунологического статуса пациентов с различными исходами септических состояний. Исследования последних лет показали, что неблагоприятные исходы при септических и эндотоксических состояниях ассоциированы с низким уровнем анти-ЛПС-антител (Bennett-

Guerrero E. et al., 1997; Strutz F. et al., 1999). В тоже время было установлено, что высокий анти-эндотоксиновый статус пациентов, характеризующийся повышенными уровнями предсуществующих антител IgG и IgM к олигосахариду кора молекулы ЛПС, несущему слабовариабельные консервативные участки, общие для различных представителей рода *Enterobacteriaceae*, коррелировал с повышением выживаемости больных с грамотрицательным сепсисом (Gibbs R.J. et al., 2004). Однако подходы к модификации анти-эндотоксинового статуса ограничены необходимостью конструирования ЛПС-иммуногена, безопасного для человека. На сегодняшний день разработан только один вариант противошоковой кандидат-вакцины на основе детоксицированного ЛПС мутантного штамма J5 *E.coli* O111:B4 Rc-хемотипа (дЛПС J5), нековалентно присоединённого к белку внешней мембраны *Neisseria meningitidis*, которая на экспериментальных моделях защищала животных от септических состояний, а при иммунизации добровольцев обеспечивала модификацию анти-эндотоксинового статуса (Cross A. et al., 2004).

В последние годы была сформулирована концепция иммунопрофилактики эндотоксического и септического шока, направленная на разработку противошоковых вакцин, на основе молекул липополисахаридов, применение которой позволит создать устойчивость организма к последующему массивному попаданию грамотрицательных бактерий и их эндотоксинов в кровотоки. Поиск новых возможных кандидатных препаратов для создания противошоковой вакцины и их комплексное исследование является актуальной научной проблемой. В качестве таких кандидатов мы исследовали биополимеры углеводной природы (БУП) энтеробактерий, среди которых были биополимеры клеточной стенки - низкоэндотоксичные и нативные липополисахариды, полученные по методу Westphal, и капсулы - экзополисахарид *Shigella sonnei*, а также комплексный препарат, состоящий из экзополисахарида и нативного ЛПС *S.sonnei*.

Цель исследования

Проведение комплексных исследований противошокового действия, иммуногенности, безопасности биополимеров углеводной природы энтеробактерий с целью получения образцов кандидат-вакцины для профилактики эндотоксического и септического шока.

Задачи исследования

1. Провести комплексное моделирование эндотоксического и септического шока.
2. Исследовать влияние предварительного введения БУП энтеробактерий на выживаемость животных и продукцию ФНО- α *in vivo* на различных моделях эндотоксического шока.

3. Изучить взаимодействие низкоэндогенных (НЭТ) и нативных ЛПС энтеробактерий с транспортным липополисахарид-связывающим белком (LBP).
4. Исследовать влияние профилактического введения мышам БУП энтеробактерий на развитие септического шока (экспериментального перитонита).
5. Разработать схемы иммунизации для профилактики септического шока препаратами низкоэндогенных ЛПС энтеробактерий.
6. Изучить продукцию анти-ЛПС-антител и возможность модификации анти-эндогенного статуса при разных схемах иммунизации низкоэндогенными ЛПС энтеробактерий.
7. Оценить безопасность НЭТ-ЛПС энтеробактерий в клинических исследованиях.

Научная новизна

Существенно расширены представления о возможностях иммунопрофилактики опасных патологических состояний – эндотоксического и септического шока. Доказана роль механизма понижающей регуляции продукции ФНО- α , инициированного предварительным введением мышам низкоэндогенных ЛПС энтеробактерий, в существенном увеличении выживаемости животных при индукции эндотоксического шока. Разработаны схемы вакцинации препаратами низкоэндогенных ЛПС энтеробактерий, индуцирующие адаптивный иммунный ответ к полиинфекции, вызывающей септический шок, с выработкой перекрёстно-реагирующих антител к олигосахариду кора молекулы ЛПС. Изучена связь между выработкой перекрёстно-реагирующих антител, специфичных к олигосахариду кора молекулы ЛПС и модуляцией септического шока (задержка развития экспериментального перитонита и продление времени жизни животных на фоне сепсиса) при профилактической иммунизации мышей низкоэндогенными ЛПС энтеробактерий. Подтверждена важность длительного анти-эндогенного иммунного ответа в качестве одного из основных защитных механизмов при септическом шоке. Впервые получены оригинальные образцы липополисахаридной кандидат-вакцины для профилактики эндотоксического и септического шока, в качестве активного компонента которой предложены низкоэндогенные ЛПС энтеробактерий, активирующие механизмы неспецифической и специфической устойчивости к шоковым состояниям, безопасные для парентерального введения человеку.

Научно-практическая значимость

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты представляют собой основу для проведения клинических исследований противошокового действия вакцинного препарата, основной субстанцией которого являются низкоэндогенные ЛПС энтеробактерий, направленного на профилактику эндотоксического и септического шока.

Внедрение противошокового препарата в практику здравоохранения имеет целью создание новой медико-социальной технологии – иммунопрофилактики шока, которая может внести дополнительный вклад в обеспечение выживаемости больных с самой различной патологией, в том числе пациентов с синдромом ишемии-реперфузии. Противошоковая вакцина, стимулирующая выработку антител к олигосахариду кора молекулы ЛПС, может лечь в основу программы профилактики шоковых состояний у лиц, подвергающихся воздействию различных травмирующих факторов, находящихся в «шоковой» группе риска (военные, пожарные, сотрудники МВД и МЧС).

Апробация диссертации

Основные результаты диссертационной работы доложены на 2-ом Международном Конгрессе «Иммунитет и болезни: от теории к терапии» (2007 г., Москва), 11-ой Ежегодной конференции «Vaccine Research» (2008 г., Балтимор, США), X Международном конгрессе «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии» (2009 г., Казань), 5-й Балтийской конференции по микробным углеводам (2012 г., Суздаль).

Публикации

Основные результаты диссертации изложены в 14 печатных работах, включающие 4 статьи в 3 научных журналах, которые входят в перечень научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций, и 10 публикаций в материалах российских и международных научных конгрессов.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора научной литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных данных, выводов и списка использованной литературы. Работа содержит 17 рисунков и 20 таблиц. Библиографический указатель содержит 202 литературных источника, из которых 12 отечественных и 190 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты проводили на гибридных мышах первого поколения (СВА×С57В1/6)F1 массой 20-22 г (филиал «Андреевка» НИЦБМТ РАМН, Россия).

Объектами исследования были биополимеры углеводной природы энтеробактерий: нативные апирогенные низко- (НМ-ЛПС) и высокомолекулярные (ВМ-ЛПС) фракции низкоэндоотоксичных ЛПС (НЭТ-ЛПС) из *S.sonnei* и *E.coli* O:55, а также комбинированные

препараты (НМ + ВМ) ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55, содержащие обе фракции в соотношении по массе 1:1; 13 и 16 серии дизентерийной кандидат-вакцины против шигелл Флекснера «Флексвак», полученные на основе НЭТ-ЛПС *S.flexneri* 2a; апирогенные низкоэндоотоксичные О-гликолипид или экзополисахарид (ЭПС) *S.sonnei* и комплексный препарат (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei*; нативные пирогенные липополисахариды *S.sonnei* и *E.coli* O:55, полученные по методу Westphal (wЛПС). Образцы препаратов БУП энтеробактерий были получены к.х.н. В.Л. Львовым в лаборатории препаративной биохимии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Изучение противошокового действия БУП энтеробактерий на различных моделях эндотоксического шока

Влияние предварительного введения комплексного препарата (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei* в дозах 0,1, 1, 10 и 25 мкг/мышь на развитие эндотоксического шока изучали на D-галактозаминовой (D-GalN) модели. Через 12 часов после внутрибрюшинного (в/б) введения препарата животным вводили 0,1 мкг wЛПС *E.coli* O:55 (Sigma-Aldrich, США) совместно с 15 мг D-GalN (Alfa Aesar, Германия) в 0,5 мл физ.раствора. Контрольной группе мышей вместо препарата вводили 0,5 мл физ.раствора.

Профилактику развития эндотоксического шока также осуществляли при прямом (без сенсибилизатора) в/б введении мышам 3 мг (ЛД₁₀₀) wЛПС *E.coli* O:55 или 2мг (4ЛД₁₀₀) wЛПС *E.coli* O:55 (Sigma-Aldrich, США) через 72 часа после в/б введения комплексного препарата (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei* в дозах 50, 100, 200 и 400 мкг/мышь, низкоэндоотоксичных НМ-ЛПС, ВМ-ЛПС и (НМ + ВМ) ЛПС *S.sonnei*, wЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55 в дозах 50, 100 или 200 мкг/мышь.

Содержание ФНО-α в сыворотках крови, взятой у мышей, которым были предварительно в/б введены исследуемые препаратами и у интактных мышей определяли с помощью тест системы Quantikine Mouse TNFα/ TNFSF1A (R&D Systems, США) методом иммуноферментного анализа (ИФА) согласно стандартной методике производителя. Кровь брали через 90 минут после индукции эндотоксического шока (Dinarelli С.А., 1999). Результаты выражали в пг/мл.

Исследование иммунопрофилактики септического шока на модели экспериментального перитонита (CLP-модель)

Моделирование экспериментального перитонита проводили на мышах с использованием CLP-модели (метод прокола и перевязки слепой кишки). Мышей оперировали под общей анестезией, вскрывали брюшину, извлекали слепую кишку и аппендикс. Слепую кишку перевязывали в прилегающей к аппендиксу области и

прокалывали её насквозь 1 или 2 раза иглой диаметром 22G. Содержимое слепой кишки выдавливали через образовавшиеся отверстия для обсеменения бактериями кишечника перитонеальной полости, затем возвращали органы обратно в брюшину и зашивали брюшную полость. Для изучения способности модулировать развитие/ течение септического шока исследуемы препараты вводили мышам в/б согласно разработанным схемам в разные сроки до проведения CLP-операции. Контрольную группу во всех экспериментах составляли интактные прооперированные животные.

Оценка связывания ЛПС энтеробактерий с липополисахарид-связывающим белком LBP

Сыворотку крови мышей истощали препаратами wЛПС и НЭТ-ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55 по следующей методике: к 100 мкл цельной сыворотки крови мышей добавляли 100 мкл раствора исследуемого препарата (10мг/ мл физ.раствора), к контрольной пробе - 100 мкл физ.раствора. Затем пробы инкубировали 1 час при 37°C, центрифугировали 5 минут при 10 000 об/мин. Надосадочную жидкость на наличие несвязанного с липополисахаридом LBP исследовали с помощью метода ИФА по стандартной методике, предложенной в наборе Mouse LBP ELISA kit (Hycult biotechnology, Cellsciences, США). Процент связавшегося LBP определяли по формуле:

$$\text{LBP}_{\text{связавшийся}}(\%) = \left(1 - \frac{[\text{LBP}]_{\text{после инкубации с препаратами}}}{[\text{LBP}]_{\text{после инкубации с физ.раствором}} \right) \times 100\%$$

Изучение иммуногенности БУП энтеробактерий на мышах (СВА×С57В1/6)F1

Для индукции адаптивного иммунного ответа мышей иммунизировали в/б дважды с интервалом в 30 дней препаратами НЭТ НМ-ЛПС, ВМ-ЛПС и (НМ + ВМ) ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55 в дозах 10 или 50 мкг/мышь. Забор крови для определения сывороточного уровня анти-ЛПС-антител с помощью ИФА проводили через 15 или 30 суток после повторного введения препаратов. В качестве контроля использовали сыворотки, полученные от интактных мышей того же возраста и привоза.

При постановке ИФА по стандартной методике в качестве антигенов использовали wЛПС *S.sonnei* и коммерческие стандартные эндотоксины различного строения и серологической специфичности wЛПС *E.coli* O:55, Rc-ЛПС *E.coli* J5, Ra-ЛПС *E.coli* EH100, Ra-ЛПС *Salmonella typhimurium* TV119 (все – Sigma-Aldrich, США). Оптическую плотность измеряли при двух длинах волн: 490 и 630 нм на фотометре iMark (Biorad, США). Результаты были обработаны с помощью программы «Excel» и представлены в виде средних значений ELISA-титров. Различия титров антител между иммунными и контрольными сыворотками

оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, а достоверность различия - согласно критерию Фишера для двух независимых выборок.

Изучение безопасности дизентерийной вакцины «Флексвак» в клинических исследованиях

Клинические исследования безопасности дизентерийной вакцины «Флексвак» проводились квалифицированным медперсоналом в Федеральном государственном учреждении здравоохранения «Центральная медико-санитарная часть №8 Федерального медико-биологического агентства» под руководством главного исследователя И.Н. Хржановской на основании разрешения на проведение клинических исследований I фазы № 432 от 14 октября 2009 г., выданного Росздравнадзором Минздравсоцразвития России, по протоколу №ФВ-1До: «Изучение реактогенности и антигенной активности дизентерийной вакцины против шигелл Флекснера “ФЛЕКСВАК”».

Варианты вакцины «Флексвак», основной субстанцией которых являются 13 и 16 серии НЭТ-ЛПС *S.flexneri* 2a, вводились взрослым добровольцам подкожно в наружную поверхность верхней трети плеча с помощью шприцев одноразового использования в объеме 0,5 мл в дозах 25 или 50 мкг (0,3 и 0,6 мкг/кг) квалифицированным медперсоналом в ФГУЗ «Центральная медико-санитарная часть №8 ФМБА». После иммунизации добровольцы находились под наблюдением врачей в стационаре ФГУЗ «Центральная медико-санитарная часть №8 ФМБА» на протяжении 5 дней. В первые сутки наблюдения они проходили медицинское обследование через 2, 4, 6 и 24 часа после введения препаратов для выявления нежелательных явлений, которые могут представлять собой любой неблагоприятный симптом, жалобу или заболевание, время возникновения которого не исключает причинно-следственной связи с применением вакцинного препарата «Флексвак». Кровь для изучения продукции провоспалительных цитокинов врачи забирали у добровольцев из вены до (0 часов) и через 2, 4 и 6 часов после введения исследуемых препаратов и передавали образцы сывороток в лабораторию полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Содержание ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 в сыворотках крови добровольцев определяли с помощью тест-систем фирмы Biosource (США) методом ИФА согласно стандартной методике производителя. Результаты выражали в пг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Экспериментальное моделирование эндотоксического и септического шока

Сложности в создании иммунотропных противошоковых препаратов диктуют необходимость тщательного подбора экспериментальных моделей для их изучения

(Remick D.G., Ward P.A., 2005). В работе были проведены эксперименты по комплексному моделированию шоковых состояний с целью воспроизведения различных патогенетических вариантов клинического течения как эндотоксического, так и септического шока.

Эндотоксический шок, обусловленный попаданием в организм чистого ЛПС, возможно моделировать на мышах с использованием D-GalN, который применяют для создания состояния гиперчувствительности к ЛПС и/или провоспалительному цитокину ФНО- α (Lehmann B.V. et al., 1987). Введение в/б сверхмалых доз (10 или 100 нг/мышь) ω ЛПС *E.coli* O:55 (Sigma-Aldrich, США) мышам (CBA \times C57B1/6)F1 не оказывает летального эффекта. При одновременном в/б введении ω ЛПС *E.coli* O:55 в тех же дозах и 15 мг/мышь D-GalN все мыши погибали. Для дальнейших исследований было решено использовать ω ЛПС *E.coli* O:55 в дозе 100 нг/мышь. Учитывая, что при совместном действии D-GalN и ЛПС животные погибают от опосредованного ФНО- α апоптоза гепатоцитов без изменения самих механизмов эндотоксикоза (Mignon A. et al., 1999), D-GalN-модель позволяет оценить эффективность защиты организма при профилактическом введении исследуемых препаратов от летального действия ФНО- α .

Прямая модель эндотоксического шока воспроизводит такой его важный аспект как поступление значительных количеств бактериального эндотоксина в организм больного. При введении массивной летальной дозы ω ЛПС *E.coli* O:55 (3 мг на мышь или 150 мг/кг) через 90 минут концентрация ФНО- α в крови животных достигала 1000 пг/мл и выше, что позволяет использовать данную модель для оценки профилактического подавляющего действия исследуемых препаратов на продукцию ФНО- α при эндотоксическом шоке.

Патогенетические механизмы септического шока имеют ряд важных особенностей по сравнению с эндотоксическим. Экспериментальный перитонит, индуцированный методом перевязки и прокола слепой кишки (CLP-модель), наиболее точно воспроизводит патофизиологические осложнения, которые имеют место при клиническом течении септического шока: полимикробный характер обсеменения и нарастание бактериальной массы в перитонеальной полости, сопровождающиеся образованием некротических тканей (Hubbard W.J. et al., 2005).

При проведении операции по индукции экспериментального перитонита у мышей (CBA \times C57B1/6)F1 слепую кишку перевязывали в прилегающей к аппендиксу области и надрезали глазными ножницами или прокалывали её насквозь (1 или 2 раза) иглой диаметром 22G (Yan J.J. et al., 2004). При надрезе слепой кишки наблюдалось самое обильное бактериальное обсеменение перитонеальной полости в рамках данного эксперимента, которое характеризовалось наименее продолжительным временем жизни как первой, так и последней особи в группе. Максимально время жизни первой и последней

особи было продлено в группе мышей с одиночным проколом слепой кишки (Рис. 1). Динамика выживаемости мышей при моделировании экспериментального перитонита позволяет оценить влияние предварительного введения исследуемых препаратов на его развитие.

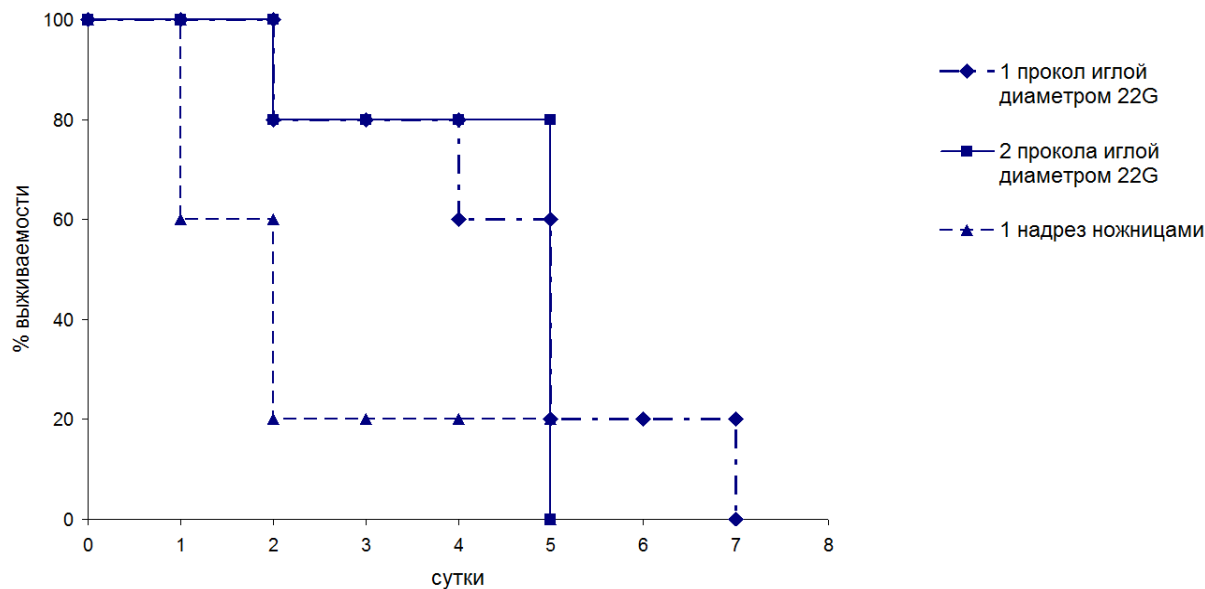


Рис. 1. Разработка CLP-модели: влияние варьирования уровня бактериального обсеменения перитонеальной полости на динамику выживаемости мышей (СВА×С57В1/6)F1.

Таким образом, изменяя число и размер проколов слепой кишки, нам удалось добиться варьирования уровня бактериального обсеменения перитонеальной полости и тяжести протекания экспериментального перитонита.

2. Установление возможности профилактики эндотоксического и септического шока при предварительном введении мышам (СВА×С57В1/6)F1 БУП *S.sonnei*

Первая серия экспериментов была посвящена изучению противошокового действия апирогенного комплексного препарата, состоящего из нового природного варианта цвиттерионного полисахарида, полученного из энтеробактерии *S.sonnei* - экзополисахарида, с небольшим добавлением эндотоксичного wЛПС *S.sonnei*. В состав ЭПС *S.sonnei* входит липидный компонент, представляющий собой диацилглицерофосфат, а полисахаридный домен идентичен с O-специфической полисахаридной цепью молекулы wЛПС *S.sonnei*.

При профилактическом в/б введении комплексный препарат (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei* обеспечивал 100 % выживаемость мышей во всех дозах (0,1, 1, 10 или 25 мкг/мышь) на D-GalN-модели эндотоксического шока, а на прямой модели - повышал выживаемость мышей в прямой зависимости от дозы введения. (Табл. 1). Предварительное в/б введение препарата (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei* в дозах 100, 200 и 400 мкг/мышь при индукции эндотоксического шока введением 3 мг/мышь (ЛД₁₀₀) wЛПС *E.coli* O:55 способствовало снижению продукции

ФНО- α in vivo до уровня ниже 500 пг/мл, в то время, как концентрация ФНО- α в сыворотках крови мышей из контрольной группы была выше 1000 пг/мл (Табл.1). Учитывая, что выживаемость мышей ассоциирована с понижающей регуляцией продукции ФНО- α , можно сделать вывод о том, что противошоковое защитное действие препарата (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei* связано с индукцией ранней эндотоксической толерантности (Shade F.U. et al., 1999).

Табл. 1. Влияние предварительного в/б введения препарата (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei* на выживаемость мышей (СВА×С57В1/6)F1 и продукцию ФНО- α при в/б инъекции ЛД₁₀₀ wЛПС *E.coli* O:55.

Доза препарата (мкг/мышь)	Кол-во мышей	Гибель мышей (часы)			% выживаемости	ФНО- α (пг/мл)
		0-24	24-48	48-72		
400	10	0	0	0	100	323
200	10	1	0	0	90	413
100	10	2	2	0	60	495
0 (Контроль)	10	8	2	0	0	1020

В следующей серии экспериментов было установлено, что при профилактическом в/б введении мышам препаратов БУП из энтеробактерии *S.sonnei* в дозе 400 мкг/мышь за 7 дней до проведения CLP-операции, комплексный препарат (ЭПС + wЛПС) и ЭПС *S.sonnei*, также как и wЛПС *S.sonnei* обеспечивали задержку развития экспериментального перитонита и продлевали время жизни мышей на фоне сепсиса (Рис. 2). Следует отметить, что в течение первых 60 часов после индукции перитонита, не погибла ни одна из мышей, получивших в/б инъекцию препаратов БУП *S.sonnei*.

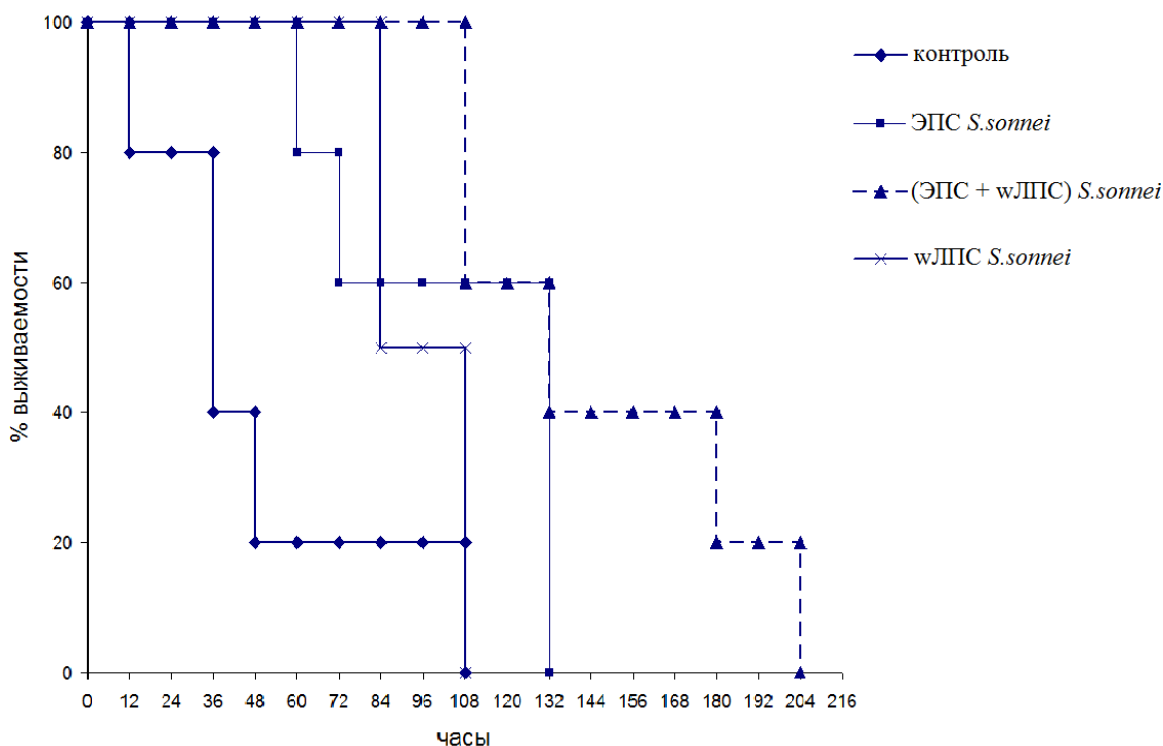


Рис. 2. Влияние предварительного в/б введения БУП из бактерии *S.sonnei* на динамику выживаемости мышей (СВА×С57В1/6)F1 при индукции экспериментального перитонита.

Наблюдались существенные отличия морфологии абдоминальной полости у мышей, которым был предварительно введён в/б препарат (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei*, и интактных мышей при вскрытии после индукции экспериментального перитонита. Явные признаки разлитого перитонита были отмечены у контрольных мышей уже через 48 часов после CLP-операции, тогда как у мышей при введении комплексного препарата, слепая кишка сохраняла целостность без явных признаков некроза через 96 ч. после CLP-операции (Рис. 3), что свидетельствует о замедлении развития экспериментального перитонита.

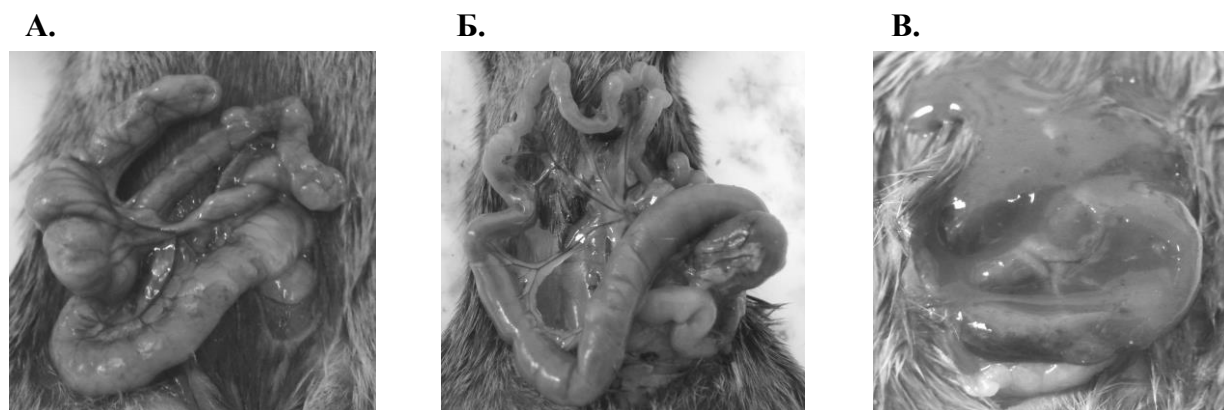


Рис. 3. Изменение морфологии абдоминальной полости у мышей при экспериментальном перитоните. **А.** Морфология абдоминальной полости перед CLP-операцией. **Б.** Профилактическое введение препарата (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei* оказывает тормозящее действие на развитие экспериментального перитонита (96 ч. после CLP-операции). **В.** Разлитой перитонит (48 ч. после CLP-операции, контрольная группа).

Установленное в эксперименте на CLP-модели влияние предварительного (за 7 суток) введения комплексного препарата (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei* на динамику выживаемости мышей (замедление развития экспериментального перитонита и продление времени жизни животных на фоне сепсиса) открывает принципиальную возможность профилактики септического шока. Нам также удалось в результате предварительного (за 72 часа) в/б введения комплексного препарата (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei* существенно снизить летальность мышей и продукцию ФНО- α при эндотоксическом шоке, вызванным введением wЛПС *E.coli* O:55 в дозе 150 мг/кг. Противошоковый эффект был достигнут в прямой зависимости от дозы введения препарата.

3. Разработка кандидат-вакцины для профилактики эндотоксического шока

Липополисахариды, продуцируемые даже одной бактериальной клеткой, обладают существенной гетерогенностью строения, и как следствие – разной биологической активностью (Alexander C., Rietschel E.T., 2001). Было показано, что только ЛПС, содержащие гексаацилированный липид А, являются лигандами (агонистами) для TLR4-рецепторов. Низкоэндотоксичные природные ЛПС, содержащие пента- и

тетраацилированные липиды А, продуцируемые нетоксичными штаммами *R.capsulatus* и *P.gingivalis*, соответственно, действуют как антагонисты по отношению к TLR4, но при этом сохраняют иммуногенный потенциал (Hajjar A.M. et al., 2002). Принимая во внимание, что структура липида А определяет биологическую активность ЛПС и наиболее часто определяемыми этиологическими агентами при эндотоксическом и септическом шоке являются бактерии (и их эндотоксины) семейства *Enterobacteriaceae*, нами проводились исследования по изучению противошокового действия оригинального класса биомолекул – низкоэндотоксичных липополисахаридов, полученных из эндотоксичных штаммов *S.sonnei* и *E.coli* O:55, являющихся структурными аналогами нативных ЛПС с преобладанием триацильных производных липида А (Рис. 4). По характеристикам токсичности и пирогенности НЭТ-ЛПС энтеробактерий были сравнимы с линейными полисахаридами, используемыми в полисахаридных вакцинах.

Для дальнейших исследований были отобраны пулы низкоэндотоксичных биомолекул из *S.sonnei* и *E.coli* O:55: низкомолекулярные липополисахариды (НМ-ЛПС), содержащие короткую О-полисахаридную цепь (менее 6 повторяющихся звеньев), высокомолекулярные липополисахариды (ВМ-ЛПС), содержащие достаточно длинную О-полисахаридную цепь (6-30 повторяющихся звеньев) (Рис 4), а также комбинированный препарат (НМ + ВМ) ЛПС, содержащий обе фракции в эквивалентном по массе соотношении 1:1.

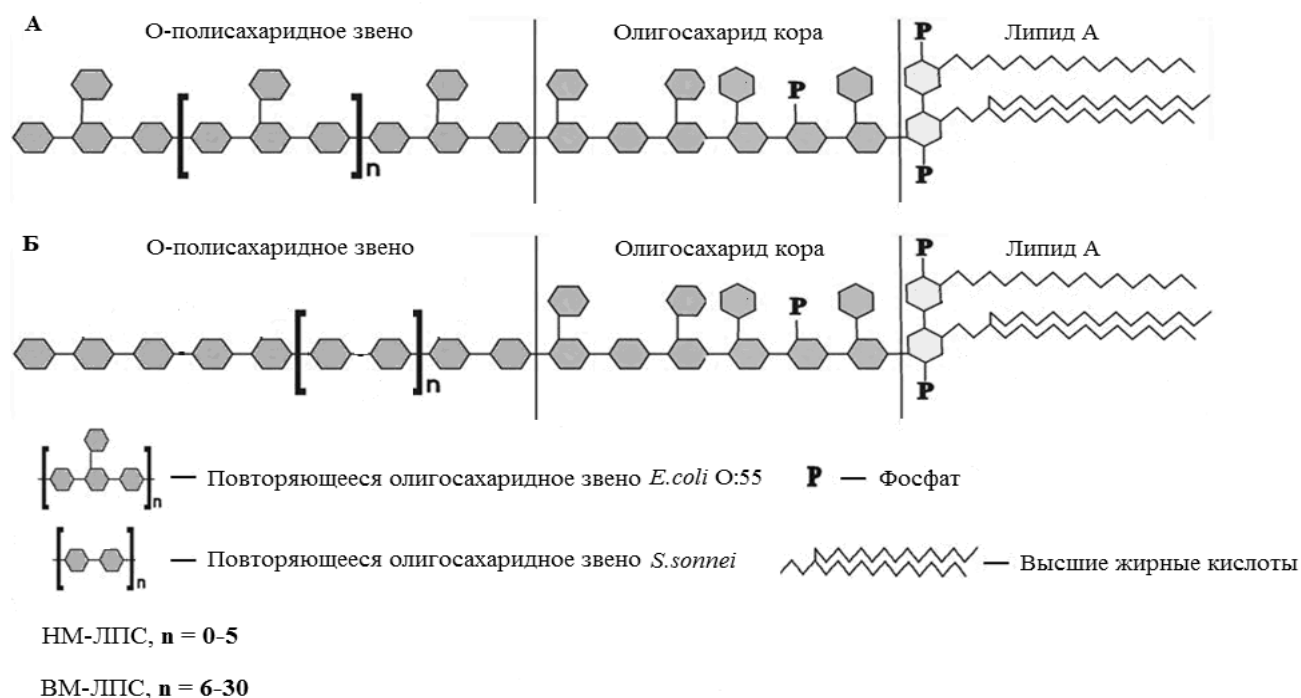


Рис. 4. Структура основных пулов биомолекул низкоэндотоксичных ЛПС *E.coli* O:55 (А) и *S.sonnei* (Б).

НЭТ-ЛПС из *S.sonnei* оказались чрезвычайно мощными профилактическими препаратами при в/б введении мышам (СВА×С57В1/6)F1 в дозах 50, 100 и 200 мкг/мышь за 72 часа до индукции эндотоксического шока путём в/б инъекции 2 мг/мышь (4ЛД₁₀₀) wЛПС *E.coli* O:55 (Sigma-Aldrich, США). Низкоэндотоксичные апирогенные НМ-ЛПС, ВМ-ЛПС и (НМ + ВМ) ЛПС *S.sonnei* были сравнимы по превентивному противошоковому действию с нативными пирогенными эндотоксинами *S.sonnei* и *E.coli* O:55, полученными по методу Westphal, и более эффективно защищали мышей от гибели по сравнению с комплексным препаратом (ЭПС + wЛПС) *S.sonnei* (Рис. 5).

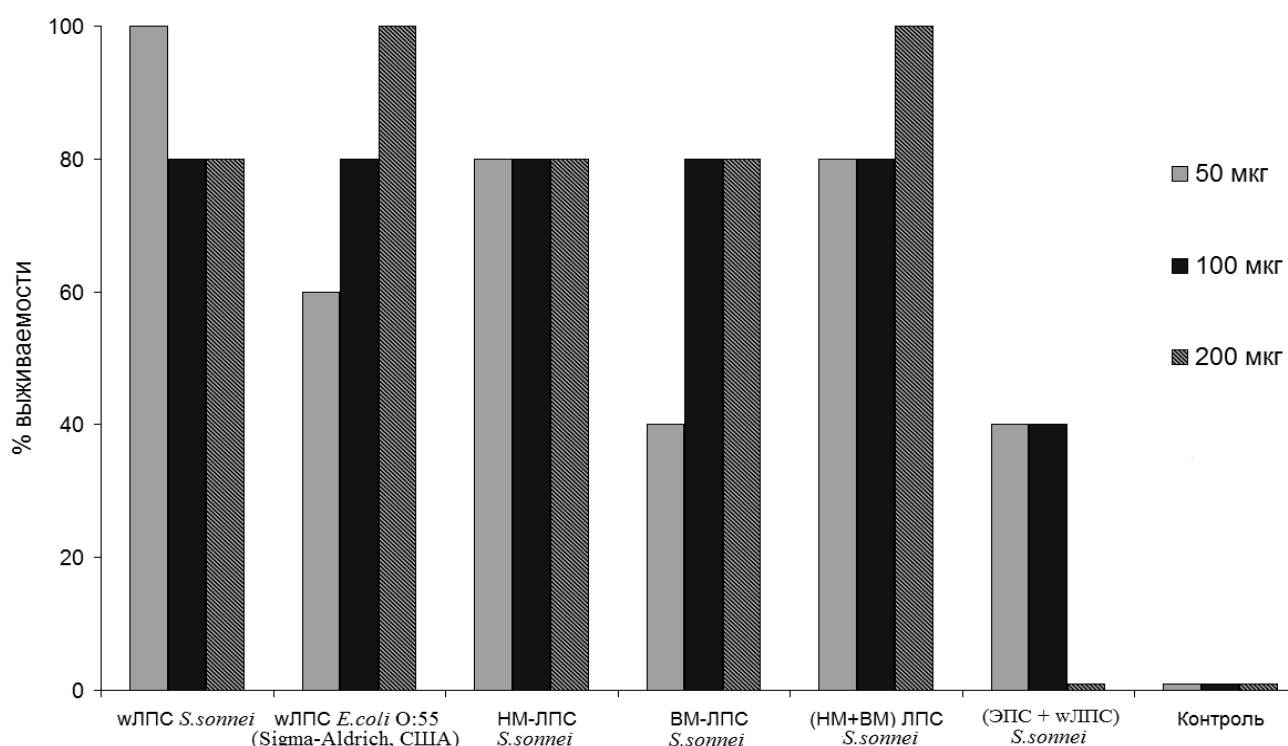


Рис. 5. Влияние предварительного в/б введения различных структурных вариантов НЭТ-ЛПС *S.sonnei* на развитие эндотоксического шока и выживаемость мышей (СВА×С57В1/6)F1 при в/б инъекции 4ЛД₁₀₀ wЛПС *E.coli* O:55.

При профилактическом в/б введении препаратов низкоэндотоксичных НМ-ЛПС, ВМ-ЛПС и (НМ + ВМ) ЛПС из *S.sonnei* в дозе 100 мкг/мышь повышенная выживаемость животных была ассоциирована с понижением продукции ФНО- α в ответ на в/б инъекцию 4ЛД₁₀₀ wЛПС *E.coli* O:55 (Sigma-Aldrich, США). В рамках этого эксперимента широко известный кандидатный противошоковый препарат – монофосфорил липид А (MPL) при предварительном введении в дозе 100 мкг/мышь не обладал противошоковым действием – уровень концентрации ФНО- α не снижался и был сопоставим с таковым в контрольной группе (Табл. 2). Полученные данные позволяют говорить о том, что, несмотря на введение

сверхвысокой дозы эндотоксина *E.coli* O:55, препараты НЭТ-ЛПС *S.sonnei* обладают полноценным толерогенным действием, тогда как MPL его утрачивает.

Табл. 2. Концентрация ФНО- α в сыворотке крови мышей (СВА \times С57Bl/6)F1 через 90 минут после индукции эндотоксического шока инъекцией 4ЛД₁₀₀ wЛПС *E.coli* O:55.

Препарат (доза введения - 100 мкг/мышь)	ФНО- α (пг/мл)
wЛПС <i>E.coli</i> O:55 (Sigma-Aldrich, США)	239,7
wЛПС <i>S.sonnei</i>	259,4
НЭТ НМ-ЛПС <i>S.sonnei</i>	288,8
НЭТ ВМ-ЛПС <i>S.sonnei</i>	324,2
НЭТ (НМ + ВМ) ЛПС <i>S.sonnei</i>	295,0
(ЭПС + wЛПС) <i>S.sonnei</i>	502,0
MPL (Sigma-Aldrich, США)	523,6
Контроль	492,0

Ранняя эндотоксическая толерантность развивается на фоне мощного снижения продукции ФНО- α и других провоспалительных цитокинов в ответ на введение ЛПС и может быть обусловлена снижением количества молекул NF κ B, доступных для активации (Cavaillon J-M., Adib-Conquy M., 2006). Было установлено, что в низких концентрациях ЛПС, связываясь с TLR4-рецепторами, активирует транскрипционный фактор IRF-3 по MyD88-независимому сигнальному пути (Jiang Z., et al., 2005). IRF-3 отвечает за продукцию ИФН- β , который активирует ключевой внутриклеточный медиатор эндотоксической толерантности – белок SOCS-1, препятствующий дезагрегации NF κ B от ингибиторного белка I κ B, и, как следствие, продукции провоспалительных цитокинов. При отсутствии SOCS-1 у мышей эндотоксическая толерантность не развивается (Nakagawa R. et al., 2002).

Отдельной задачей наших исследований являлось изучение транспортных характеристик противошоковых препаратов, основанное на оценке их взаимодействия с транспортным ЛПС-связывающим белком LBP. Различия в способности связываться с LBP между низкоэндотоксичными НМ-ЛПС, ВМ-ЛПС из эндотоксичных бактерий *S.sonnei* и *E.coli* и классическими ЛПС из тех же штаммов, полученными по методу Westphal, были особенно значимы для препаратов НЭТ-ЛПС из *E.coli* O:55 (Табл. 3).

Табл. 3. Эффективность связывания НЭТ-ЛПС и ЛПС, полученных по методу Westphal, из *S.sonnei* и *E.coli* O:55 с транспортным ЛПС-связывающим белком LBP.

Препарат (10 мг/мл)	Концентрация LBP в сыворотке после инкубации с препаратами (мкг/мл)	Связавшийся LBP (%)
НЭТ НМ-ЛПС <i>S.sonnei</i>	2,33	50,9
НЭТ ВМ-ЛПС <i>S.sonnei</i>	2,33	50,9
wЛПС <i>S.sonnei</i>	3,07	35,3
НЭТ НМ-ЛПС <i>E.coli</i> O:55	1,37	71,15
НЭТ ВМ-ЛПС <i>E.coli</i> O:55	1,6	66,3
wЛПС <i>E.coli</i> O:55	3,35	29,4
Контроль (0 мкг/ мл)	4,75	0

Эффективность взаимодействия ЛПС с TLR4-рецепторами коррелирует с его способностью связываться с LBP (Dixon D.R., Darveau R.P., 2005). Учитывая высокое сродство к LBP НЭТ-ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55, структурно являющихся антагонистами TLR4-рецепторов, можно предположить, что они будут конкурентно связываться с последними и, тем самым ингибировать провоспалительную активность эндотоксинов патогенов, что создаёт предпосылки для применения НЭТ-ЛПС энтеробактерий в качестве терапевтического препарата на фоне эндотоксикозов различного генеза.

Полученные в результате исследования противошоковых свойств НЭТ-ЛПС энтеробактерий данные (профилактика развития эндотоксического шока, снижение продукции ФНО- α , эффективное связывание с LBP) позволяют рассматривать НЭТ-ЛПС *S.sonnei* в качестве активных компонентов толерогенной кандидат-вакцины для профилактики эндотоксического шока, эндотоксикозов различной этиологии и состояний, связанных с синдромом ишемии-реперфузии.

4. Клинические исследования безопасности НЭТ-ЛПС энтеробактерий

В рамках клинических испытаний кандидатной дизентерийной вакцины против шигелл Флекснера «Флексвак» была исследована безопасность активных компонентов данной вакцины – 13 и 16 серии НЭТ-ЛПС *S.flexneri* 2a. Метод получения, структура, физико-химические и иммунохимические характеристики, показатели чистоты и пирогенности для препаратов НЭТ-ЛПС, полученных из энтеробактерии *S.flexneri* 2a, являются близкими к аналогичным параметрам для препаратов НЭТ-ЛПС полученных из *S.sonnei* и *E.coli* O:55.

При подкожной иммунизации добровольцев сериями НЭТ-ЛПС *S.flexneri* 2a, системные эндотоксичные побочные реакции, такие как озноб, учащение пульса, падение систолического артериального давления, диарея, головная боль не были зарегистрированы. Отдельно следует отметить отсутствие температурных реакций при введении препаратов НЭТ-ЛПС *S.flexneri* 2a, что является прямым подтверждением их низкой эндотоксичности и апиrogenности для человека. У двух из 25 добровольцев была зарегистрирована незначительная гиперемия в месте введения НЭТ-ЛПС *S.flexneri* 2a в течение 2-х часов после инъекции. Такие проявления местных эндотоксичных побочных реакций как болезненность, покраснение, образование инфильтратов не было выявлено за весь период наблюдения ни у одного из добровольцев.

При изучении уровня провоспалительных цитокинов в крови добровольцев было показано, что концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6, определяемые в сыворотках после введения вакцинных препаратов «Флексвак», на основе 13 и 16 серий НЭТ-ЛПС *S.flexneri* 2a,

были низкими и достоверно не отличались от значений, зарегистрированных в сыворотках, взятых у добровольцев до введения препаратов (Табл. 4).

Табл. 4. Уровни провоспалительных цитокинов в сыворотках крови добровольцев до и после иммунизации сериями препарата «Флексвак», полученных на основе НЭТ-ЛПС *S.flexneri* 2a.

Параметры	Среднее значение (пг/мл) ± среднее отклонение		
	13 серия/ 50 мкг	13 серия/ 25 мкг	16 серия/ 50 мкг
ФНО-α			
0 ч	11,23 ± 2,2	12,75 ± 1,43	12,86 ± 1,6
2 ч	17,95 ± 4,34	17,74 ± 2,25	17,45 ± 1,73
4 ч	13,54 ± 4,18	13,52	11,76 ± 2,35
6 ч	11,76	19,89 ± 1,69	13,08
ИЛ-1β			
0 ч	0,005 ± 0,009	0	0,05
2 ч	0	0	0,02
4 ч	1,49 ± 0,51	0	0,3
6 ч	0	0	0,05
ИЛ-6			
0 ч	1,26 ± 0,91	1,18 ± 0,63	0,25 ± 0,18
2 ч	1,96 ± 1,53	0,74 ± 0,49	2,86 ± 1,8
4 ч	6,06 ± 2,1	1,78 ± 0,74	2,26 ± 0,93
6 ч	2,59	2,83 ± 1,32	1,32

Клинические испытания выявили принципиальную возможность безопасного парентерального введения человеку препаратов НЭТ-ЛПС из *S.flexneri* 2a в дозах до 50 мкг (0,7 мкг/кг). Можно ожидать, что структурные аналоги НЭТ-ЛПС *S.flexneri* 2a, такие как НЭТ-ЛПС из *S.sonnei* и *E.coli* O:55, также будут безопасны при парентеральном введении человеку в рамках клинических исследований.

5. Индукция ЛПС-специфических антител и модификация анти-эндотоксинового статуса при иммунизации мышей (СВА×С57В1/6)F1 НЭТ-ЛПС энтеробактерий

Анти-эндотоксиновый статус пациента является одним из немногих факторов, оказывающих влияние на исход шоковых состояний в клинике. Высокие уровни натуральных антител у пациентов к доменам молекулы ЛПС, в первую очередь к олигосахариду кора, ассоциированы с благоприятными исходами и отсутствием осложнений при септическом и эндотоксическом шоке (Gibbs R.J. et al., 2004). Поэтому повышение анти-эндотоксинового статуса и индукция адаптивного иммунного ответа к ЛПС при иммунизации может рассматриваться в качестве стратегического подхода к иммунопрофилактике шоковых состояний (Cross A., 2010).

Индукция адаптивного противошокового иммунного ответа у экспериментальных животных представляет собой нетривиальную и сложную методическую задачу, реализация которой связана с разработкой оптимальных схем иммунизации. С другой стороны для

селективного определения пулов антител, специфичных к разным доменам молекулы ЛПС, потребовалось сформировать панель антигенов, выявляющих перекрёстно-реагирующие антитела к олигосахариду кора молекулы ЛПС, в которую вошли ЛПС *E.coli* и *S.typhimurium* Ra- и Rc-хемотипов (Рис. 6).

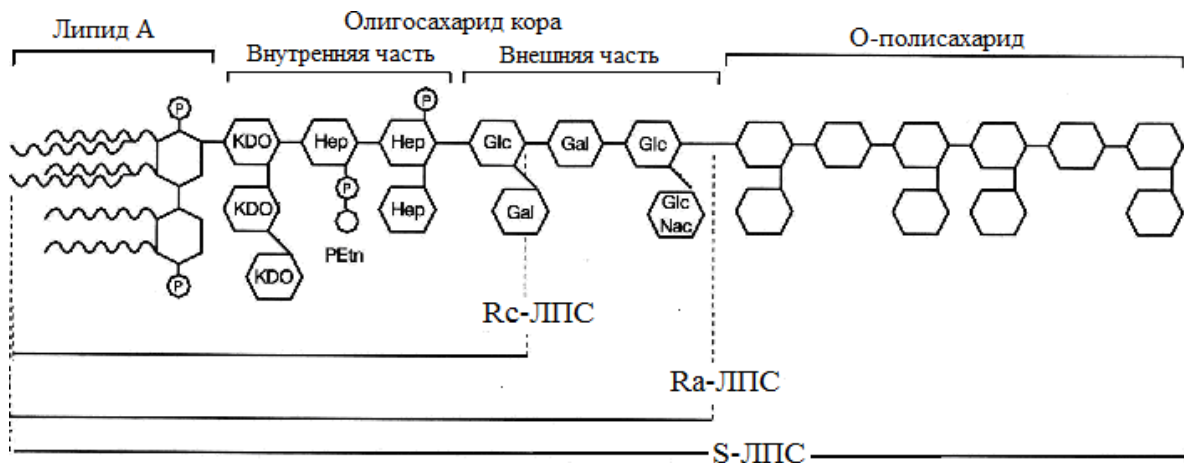


Рис.6. Схема строения липополисахаридов различных хемотипов.

Мышей (СВА×С57В1/6)F1 иммунизировали в/б низкоэндоотоксичным ВМ-ЛПС *S.sonnei* в дозах 10 или 50 мкг/мышь один, два (с интервалом в 30 дней) или три раза (с интервалом в 30 и 21 день). Забор крови в каждой группе осуществляли через 15 суток после последней иммунизации. По данным ИФА двукратная схема иммунизации была признана оптимальной для индукции О-полисахарид-специфичного иммунного ответа и выработки перекрёстно-реагирующих IgG-антител к ЛПС *E.coli* O:55, Ra-ЛПС *E.coli* EH100, Rc-ЛПС *E.coli* J5. Ra- и Rc-хемотипы ЛПС, не имеют О-полисахаридного домена (Рис.6), что позволяет утверждать о продукции антител именно к олигосахариду кора молекулы ЛПС.

Для модификации анти-эндотоксинового статуса мышам двукратно в/б вводили препараты низкоэндоотоксичных НМ-ЛПС, ВМ-ЛПС и (НМ + ВМ) ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55 в дозах 10 или 50 мкг/мышь с интервалом в 30 дней. Забор крови осуществляли через 15 или 30 дней после вторичной иммунизации. В результате ИФА были выявлены антитела IgG и IgM, специфичные к О-полисахаридным доменам wЛПС гомологичных штаммов, и перекрёстно-реагирующие, специфичные к олигосахариду кора молекул Ra-ЛПС *E.coli* EH100 и *S.typhimurium* TV119, Rc-ЛПС *E.coli* J5 (Табл. 5).

В результате проведённых экспериментов установлено, что выработка О-полисахарид- и кор-специфических антител IgG-изотипа сохраняется до 45-60 дней после первичной иммунизации, и до 15-30 дней, после повторного введения препаратов НЭТ-ЛПС энтеробактерий. Такой иммунный ответ можно считать долговременным. Факт наличия

длительно персистирующих IgG-антител может выступать свидетельством в пользу возможности формирования иммунологической памяти при таких схемах иммунизации.

Табл.5. Коррекция анти-эндотоксинового статуса в эксперименте при иммунизации мышей (СВА×С57В1/6)F1 препаратами НЭТ-ЛПС энтеробактерий.

Препараты	О-специфические антитела		Перекрытно-реагирующие антитела к области кора молекулы ЛПС					
	IgG	IgM	IgG			IgM		
			Ra-ЛПС <i>E.coli</i> EH100	Rc-ЛПС <i>E.coli</i> J5	Ra-ЛПС <i>S.typhimurium</i> TV119	Ra-ЛПС <i>E.coli</i> EH100	Rc-ЛПС <i>E.coli</i> J5	Ra-ЛПС <i>S.typhimurium</i> TV119
HM-ЛПС <i>S.sonnei</i>	+++	+++	HO	HO	+	+	+	+++
BM-ЛПС <i>S.sonnei</i>	+++	+++	+	++	+	++	++	++
(HM+BM) ЛПС <i>S.sonnei</i>	+++	++	++	++	++	+	++	++
HM-ЛПС <i>E.coli</i> O:55	++	+++	+	HO	+	++	+	++
BM-ЛПС <i>E.coli</i> O:55	+++	+++	HO	+	HO	++	++	HO
(HM+BM) ЛПС <i>E.coli</i> O:55	+++	+++	+	HO	+	++	+	+

+++ - антитела определены при обеих схемах иммунизации во всех дозах

++ - антитела определены при обеих схемах иммунизации не во всех дозах

+ - антитела определены при иммунизации только по одной схеме

HO – антитела не были обнаружены

Наиболее значимые работы последних лет по коррекции анти-эндотоксинового статуса связаны с созданием препаратов на основе дЛПС J5 *E.coli* O111:B4. Было показано, что уровень анти-J5 антител коррелировал с повышением выживаемости иммунизированных животных при последующем их заражении бактериальными клетками *P.aeruginosa* или *K.pneumoniae* (Cross A., 2010). Нам также удалось при иммунизации BM-ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55 и (HM + BM) ЛПС *S.sonnei* индуцировать выработку противошоковых перекрытно-реагирующих антител IgG и IgM, специфичных к Rc-ЛПС J5 *E.coli*.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что профилактическая иммунизация мышей НЭТ-ЛПС энтеробактерий обеспечивает модификацию анти-эндотоксинового статуса в эксперименте, связанную с формированием адаптивного иммунного ответа и иммунологической памяти, основанной на стабильной выработке кор- и О-полисахарид-специфических антител IgG-изотипа.

6. Профилактика развития септического шока на модели экспериментального перитонита при иммунизации мышей (СВА×С57В1/6)F1 НЭТ-ЛПС энтеробактерий

Для изучения способности НЭТ-ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55 модулировать развитие/ течение септического шока исследования продолжили с использованием модели экспериментального перитонита (CLP-модель). Модификация анти-эндотоксинового статуса

при двукратном, с интервалом в 30 дней, в/б введении препаратов НЭТ-ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55 в дозах 10 или 50 мкг/мышь, была подтверждена регистрацией перекрёстно-реагирующих кор-специфических антител через 15 суток после повторного введения препаратов. Это стало обоснованием для использования данной схемы противошоковой иммунизации на модели экспериментального перитонита (перевязка и двукратная перфорация слепой кишки иглой диаметром 22G).

При проведении CLP-операции через 45 суток после первичного введения мышам препаратов НЭТ-ЛПС *S.sonnei* лучшими защитными свойствами обладали такие образцы как ВМ-ЛПС *S.sonnei* в дозе 10 мкг/мышь и (НМ + ВМ) ЛПС *S.sonnei* в дозе 50 мкг/мышь, обеспечивающие задержку развития экспериментального перитонита на 27 ч. и 48 ч., соответственно. Время жизни последних гибнущих особей в этих же группах было продлено на 1,5 – 3,5 суток (Табл. 6).

Табл. 6. Выживаемость мышей (СВА×С57В1/6)F1, иммунизированных двукратно НЭТ-ЛПС *S.sonnei*, при индукции экспериментального перитонита через 45 суток после первичного введения препаратов.

Препарат	Доза (мкг/мышь)	Гибель первой особи (часы)	Гибель последней особи (часы)	Δt* (первая)	Δt* (последняя)
НМ-ЛПС <i>S.sonnei</i>	10	42	162	3	36
НМ-ЛПС <i>S.sonnei</i>	50	45	210	6	84
ВМ-ЛПС <i>S.sonnei</i>	10	66	162	27	36
ВМ-ЛПС <i>S.sonnei</i>	50	42	162	3	36
контроль	0	39	126	---	---

Препарат	Доза (мкг/мышь)	Гибель первой особи (часы)	Гибель последней особи (часы)	Δt* (первая)	Δt* (последняя)
(НМ+ВМ) ЛПС <i>S.sonnei</i>	10	18	141	---	48
(НМ+ВМ) ЛПС <i>S.sonnei</i>	50	69	186	48	93
контроль	0	21	93	---	---

Δt* = разница времени жизни иммунизированных и контрольных мышей (часы).

Возможность профилактики развития септического шока также была продемонстрирована при в/б иммунизации мышей препаратами НЭТ-ЛПС из *E.coli* O:55. Лучшими протективными противошоковыми свойствами обладали препараты ВМ-ЛПС *E.coli* O:55 в дозе 10 мкг и (НМ + ВМ) ЛПС *E.coli* O:55 в дозе 50 мкг, замедляя развитие экспериментального перитонита на 69 ч. и 72 ч., соответственно. Время жизни последних особей в этих же группах было продлено на 2-3 суток (Табл. 7).

Табл. 7. Выживаемость мышей (СВА×С57В1/6)F1, иммунизированных двукратно НЭТ-ЛПС *E.coli* O:55, при индукции экспериментального перитонита через 45 суток после первичного введения препаратов.

Препарат	Доза (мкг/мышь)	Гибель первой особи (часы)	Гибель последней особи (часы)	Δt* (первая)	Δt* (последняя)
НМ-ЛПС <i>E.coli</i> O:55	10	21	93	0	0
НМ-ЛПС <i>E.coli</i> O:55	50	45	150	24	57
ВМ-ЛПС <i>E.coli</i> O:55	10	90	141	69	48
ВМ-ЛПС <i>E.coli</i> O:55	50	42	90	21	---
(НМ+ВМ) ЛПС <i>E.coli</i> O:55	10	45	186	24	93
(НМ+ВМ) ЛПС <i>E.coli</i> O:55	50	93	165	72	72
контроль	0	21	93	---	---

Δt* = разница времени жизни иммунизированных и контрольных мышей (часы)

Отметим, что индукция адаптивного иммунного ответа и профилактика развития септического шока были реализованы при введении препаратов НЭТ-ЛПС энтеробактерий по одной и той же схеме, что может свидетельствовать о вовлечённости анти-ЛПС-антител в процесс элиминации бактериальных патогенов, оказывающихся в перитонеальной полости при проколе слепой кишки. Возможность модуляции септического шока при проведении CLP-операции через 45 суток после первичного введения препаратов ВМ-ЛПС и (НМ + ВМ) ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55, позволяет рассматривать эти образцы в качестве основных кандидатов для создания вакцины для профилактики септического шока.

ВЫВОДЫ

1. Разработана концепция иммунопрофилактики эндотоксического и септического шока, основанная на индукции ранней эндотоксической толерантности и модификации анти-эндотоксинового статуса при предварительном введении экспериментальным животным НЭТ-ЛПС энтеробактерий.
2. Установлен эффект профилактики развития эндотоксического шока при предварительном (за 72 часа) введении мышам НЭТ-ЛПС *S.sonnei*, связанный со значительным снижением летальности и продукции ФНО-α *in vivo*.
3. НЭТ-ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55 связываются в 1,5-2 раза эффективнее с транспортным белком LBP по сравнению с эндотоксичными ЛПС, полученными из тех же штаммов.
4. Установлена возможность профилактики развития септического шока при предварительном введении НЭТ-ЛПС *S.sonnei* и *E.coli* O:55 за 45 суток до индукции экспериментального перитонита.

5. Проведена модернизация подхода к моделированию шоковых состояний, основанная на анализе и комплексном использовании экспериментальных моделей, воспроизводящих различные патогенетические варианты эндотоксического и септического шока.
6. Двукратная схема иммунизации НЭТ-ЛПС энтеробактерий и доза 50 мкг/мышь (2500 мкг/кг) признаны оптимальными для модификации анти-эндотоксинового статуса у мышей (СВА×С57В1/6)F1.
7. При двукратной иммунизации мышей (СВА×С57В1/6)F1 НЭТ-ЛПС энтеробактерий достигнута дозозависимая индукция длительного (≥ 45 дней) адаптивного иммунного ответа к полиинфекции за счёт выработки перекрёстно-реагирующих IgG-антител к олигосахариду кора молекулы ЛПС
8. В клинических исследованиях была установлена возможность безопасного парентерального введения человеку дизентерийной кандидат-вакцины «Флексвак», полученной на основе НЭТ-ЛПС *S.flexneri* 2a, в дозах до 50 мкг (0,7 мкг/кг).
9. Впервые в качестве активного компонента кандидат-вакцины для профилактики эндотоксического и септического шока предложены низкоэндотоксичные липополисахариды энтеробактерий, активирующие механизмы неспецифической и специфической устойчивости к шоковым состояниям, безопасные для парентерального введения человеку.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кондакова А.Н., Виноградов Е.В., Шехт М.Е., Маркина А.А., Линднер Б., Львов В.Л., Апарин П.Г., Книрель Ю.А. Структура олигосахаридной области (кора) липополисахаридов *Shigella flexneri* типов 2a и 2b. **Биоорганическая химия**, 2010, т. 36, № 3, с. 429-432.
2. Маркина А.А. Комплексное экспериментальное моделирование шоковых состояний. **Иммунология**, 2012, т.33, №5, с. 250-254.
3. Маркина А.А., Львов В.Л., Апарин П.Г. Коррекция септического и эндотоксического шока при иммунизации цвиттерионным экзополисахаридом *Shigella sonnei*, фаза 1. **Иммунология**, 2013, т. 34, № 1, с. 39-42.
4. Маркина А.А., Кондратьева И.А. Исследование защитных свойств биополимеров углеводной природы *Shigella sonnei* на моделях эндотоксического шока. **Вестник Московского университета. Серия 16, Биология**, 2013, №2, с. 12-15.
5. Маркина А.А., Львов В.Л., Курбатова И.Ю., Шмиголь В.И., Апарин П.Г. Влияние иммунизации биополимерами углеводной природы (БУП), продуцируемых *Shigella sonnei*, фаза 1, на выживаемость мышей и уровни провоспалительных цитокинов при

- индукции эндотоксического шока // Российский аллергологический журнал, 2007, №3, приложение 1, с. 311-312.
6. Маркина А.А., Апарин П.Г. Увеличение выживаемости мышей (СВА×С57В1/6)F1, иммунизированных сериями вакцины «Шигеллвак» и биополимерами углеводной природы (БУП) из *Shigella sonnei* при моделировании экспериментального перитонита // Российский аллергологический журнал, 2007, №3, приложение 1, с. 312.
 7. Markina A.A., L'vov V.L., Kurbatova I.U., Aparin P.G. Immunization with “Shigellvac” lot 23 Vaccine and *Shigella sonnei* Carbohydrate Biopolymers Protects Mice against Cecal Ligation and Puncture – Induced Lethality and Downregulates Proinflammatory Cytokines Production *in vivo* under Experimental Endotoxic Shock Model // Abstracts of The Eleventh Annual Conference on Vaccine Research, Baltimore, USA, 2008, P. 77-78.
 8. Маркина А.А., Апарин П.Г., Львов В.Л., Курбатова И.Ю. Защитный эффект профилактической вакцинации мышей (СВА×С57В1/6)F1 шигеллёзной вакциной «Шигеллвак» и низкоэндотоксичным липополисахаридом *Sh. sonnei*, фаза 1, при моделировании экспериментального перитонита // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 2008, с.77.
 9. Маркина А.А., Апарин П.Г., Львов В.Л., Курбатова И.Ю., Шмиголь В.И. Увеличение выживаемости мышей (СВА×С57В1/6)F1, иммунизированных низкоэндотоксичными нативным и модифицированными липополисахаридами *Shigella sonnei*, фаза 1, при индукции D-галактозаминной и прямой моделей эндотоксического шока // Российский аллергологический журнал, 2009, №3, выпуск 1, с. 367.
 10. Маркина А.А. Защитный эффект профилактической вакцинации мышей (СВА×С57В1/6)F1 низкоэндотоксичным липополисахаридом *Shigella sonnei*, фаза 1, при моделировании экспериментального перитонита // Российский аллергологический журнал, 2009, №3, выпуск 1, с. 368.
 11. L'vov V.L., Shekht M.A., Markina A.A., Ledov V.A., Golovina M.E., Ankudinov I.V., Aparin P.G., Kondakova A.N., Perepelov A.V., Knirel Y.A. Chemically modified lipopolysaccharides of *Shigella* as potential protective preparations // Тезисы докладов научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», Украина, Крым, Новый Свет, 2009, с.120.
 12. Апарин П.Г., Львов В.Л., Ванеева Н.П., Ёлкина С.И., Головина М.Э., Сергеев В.В., Шмиголь В.И., Книрель Ю.А., Курбатова И.Ю., Анкудинов И.В., Лучина Н.Н.,

- Суркова И.Г., Вернер И.К., Ледов В.А., Маркина А.А., Шехт М.Е. Бактериальные кишечные инфекции: иммунопрофилактика и контроль распространения в различных регионах Евразии // Тезисы докладов международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней», Новосибирск, 2009, с. 226-229.
13. Маркина А.А. Индукция ранней и поздней эндотоксической толерантности при профилактической вакцинации мышей (СВА×С57В16)F1 низкоэндотоксичными биополимерами углеродной природы *Shigella sonnei*, фаза 1 // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения и инфекционных болезней», Москва, 2010, с. 74.
14. Markina A.A., L'vov V.L., Golovina M.E., Kurbatova I.U., Ankudinov I.V., Aparin P.G. Immunization with *Shigella sonnei* exopolysaccharide protects mice (CBA×C57Bl/6)F1 against lipopolysaccharide-induced lethality and downregulates TNF- α production *in vivo* in experimental endotoxic shock models // Сборник тезисов 5-й Балтийской Конференции по микробным углеводам, Суздаль, 2012, P41.