

## SPECIFICITY OF LYMPHOCYTES BINDING THE CAPSULE ANTIGEN OF PLAGUE BACTERIA AND AN IMMUNOLOGICAL REAGENT FOR THEIR DETECTION

Karalnik B.V.<sup>1</sup>, Zhunussova G.B.<sup>1</sup>, Denisova T.G.<sup>1</sup>, Ponomareva T.S.<sup>2</sup>, Deryabin P.N.<sup>2</sup>, Atshabar B.B.<sup>2</sup>, Turuzhanova A.A.<sup>1</sup>, Tugambayev T.I.<sup>2</sup>, Zakaryan S.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*H. Zhumatov Scientific Hygiene and Epidemiology Center*

*34, Makataev str., Almaty, 050002, Kazakhstan*

<sup>2</sup>*M. Aykimbayev Kazakh Scientific Center of Quarantine and Zoonotic Diseases*

*14, Kapalskaya str., Almaty, 050054, Kazakhstan*

*lbimvac@mail.ru*

### ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the specificity of an immunological reagent developed to identify lymphocytes with receptors for the dominant antigen (F1) of plague bacteria (lymphocytes with F1 receptors; LfR). Rabbits were used to test immunogens, consisting of live and inactivated plague vaccine, and inhibitors of LfR. Interactions between immunological reagents, consisting of suspensions of three inactivated *Yersinia* species (*Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*); antigens (F1 and lipopolysaccharide of *Y. pestis*); and the immunomodulators, betaleukin (recombinant interleukin 1 $\beta$ ) and polyoxidonium were also investigated. Intercell adhesion methods were used to detect LfR and determine their inhibition. The specificity of the reagent developed was experimentally determined using homologous and heterologous LfR antigens. The clonal nature of LfR and the development of weakly expressed, non-specific factors during the early phase of the adaptive immune response were confirmed after immunisation of the plague vaccination model, by inhibition of LfR identification using various antigens. The expression of a weak, non-specific response did not affect the specific detection of LfR, indicating the specificity of the developed immunological reagent as a clone of LfR.

Keywords: plague, early phase of adaptive response, immunological reagent, specificity.

УДК 579.083.13; 612.017.1:616.9

## СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ КАПСУЛЬНЫЙ АНТИГЕН ЧУМНЫХ БАКТЕРИЙ, И ИММУНОРЕАГЕНТА ДЛЯ ЕГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Каральник Б.В.<sup>1</sup>, Жунусова Г.Б.<sup>1</sup>, Денисова Т.Г.<sup>1</sup>, Пономарева Т.С.<sup>2</sup>, Дерябин П.Н.<sup>2</sup>, Атшабар Б.Б.<sup>2</sup>, Туружанова А.А.<sup>1</sup>, Тугамбаев Т.И.<sup>2</sup>, Закарян С.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Научный центр гигиены и эпидемиологии им. Х. Жуматова*

*ул. Макатаева, 34, Алматы, 050002, Казахстан*

<sup>2</sup>*Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева*

*ул. Капальская, 14, Алматы, 050054, Казахстан*

*lbimvac@mail.ru*

### АБСТРАКТ

Цель работы – анализ специфичности разработанного иммунореактива для определения лимфоцитов с рецепторами к доминантному антигену чумных бактерий (ЛФР) и, соответственно – специфичности определения ЛФР. В работе использованы кролики, иммуноген – живая и инактивированная чумная вакцина EV, ингибиторы взаимодействия ЛФР и иммунореактива – инактивированные суспензии 3 видов иерсиний (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*), антигены F1 и липополисахарид чумных бактерий, иммуномодуляторы – беталейкин (рекомбинантный интерлейкин 1 бета) и полиоксидоний. Применены методы клеточной адгезии для выявления ЛФР и его ингибции различными антигенами. Экспериментально по ингибции гомо- и гетерологичными антигенами выявления ЛФР при использовании разработанного иммунореактива доказана специфичность разработанного диагностического препарата. На модели иммунизации чумной вакциной подтверждены клонированность ЛФР и развитие слабовыраженного неспецифического компонента ответа в течение ранней фазы адаптивного ответа. Развитие слабого неспецифического компонента не нарушает специфичность выявления ЛФР, обусловленную не только специфичностью разработанного иммунореактива, но и клонированностью ЛФР.

Ключевые слова: чума, ранняя фаза адаптивного ответа, иммунореактив, специфичность.

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что антигенспецифический ответ начинается с формирования лимфоцитов, имеющих рецепторы к антигену возбудителя – ЛфР [1,2], их можно выявлять различными способами. Наиболее часто (фиксированных ацетальдегидом эритроцитов быка) с сорбированным антигеном возбудителя/иммуногена [3]. Применение метода для диагностики и изучения роли таких лимфоцитов в иммуногенезе требует оценки специфичности используемого реагента и получаемых при его использовании результатов. Недавно показано, что выявление ЛфР, связывающих капсульный антиген возбудителя чумы – F1, позволяет изучать динамику ранней фазы антигенспецифического ответа и связь между нею и эффекторной фазой ответа при иммунизации чумной вакциной в эксперименте [2]. В этой работе использовали разработанный нами иммунореагент, представляющий собой взвесь фиксированных ацетальдегидом эритроцитов быка, конъюгированных с F1 антигеном *Y. pestis*.

Цель настоящей работы – анализ специфичности разработанного иммунореактива для определения лимфоцитов с рецепторами к доминантному антигену чумных бактерий (ЛфР) и, соответственно – специфичности определения ЛфР.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 12 кроликах массой 2,0-2,5 кг. 6 кроликам ввели внутривенно вакцину EV ( $3 \cdot 10^8$  клеток) в 0,5 мл 0,85% раствора NaCl, другим 6 кроликам – 0,5 мл инактивированной формальдегидом этой вакцины в той же концентрации. Двум из 6 кроликов, иммунизированных живой вакциной, одновременно с вакциной ввели внутривенно по 0,5 мл 0,85% NaCl (контрольная группа), двум – также ввели полиоксидоний в дозе 0,3 мг/кг массы тела и двум – беталейкин в дозе 0,5 мкг. 6 других кроликов, иммунизированных инактивированной вакциной, были разделены на такие же 3 группы.

У каждого из 12 кроликов через 4 и 7 дней после иммунизации из краевой вены уха в пробирки с гепарином забирали по 12-14 мл крови. Из каждой индивидуальной пробы крови на градиенте фиколл-верографин плотности 1,077 выделяли популяцию мононуклеаров (не менее 97% лимфоцитов). После доведения каждой индивидуальной взвеси лимфоцитов до концентрации  $4 \cdot 10^6$  клеток ее вносили в 12 пробирок в объеме 20 мкл. Каждый из примененных в опыте ингибиторов, включая контроль – 0,85% раствор NaCl, вносили в 2 пробирки в таком же объеме. Все смеси «лимфоцит-соответствующий ингибитор» экспонировали 30 мин при 37°C. После этого в первые пробирки из каждой вышеописанной пары вносили F1 реагент, а во вторые пробирки – контрольные эритроциты, не связавшие F1 антиген. После тщательного немедленного перемешивания смеси экспонировали 5 мин при 37°C и 60 мин – при 4-8°C. Затем из каждой экспонированной смеси делали мазки, их фиксировали этиловым спиртом и окрашивали 0,1% раствором метиленового синего, содержащим 0,06% натрия бикарбоната. В каждой мазке подсчитывали в 7 сотнях лимфоцитов порознь количество лимфоцитов, связавших не менее 3 корпускул F1 реагента (ЛфРс) или контрольных эритроцитов (ЛфРн).

Обычно применяемый принцип дизайна оценки специфичности иммунореактивов для определения ЛфР состоит в оценке ингибирования связывания разработанного иммунореактива лимфоцитами в результате его предварительной экспозиции с различными антигенами – гомологичными и гетерологичными. В качестве гомологичного антигена использовали формализированную взвесь *Yersinia pestis* штамма EV, содержащую 2 млрд. микробных клеток в 1 мл, в качестве гетерологичных – аналогично приготовленные взвеси штаммов: дефектного по F1 антигену штамма *Y. pestis* 3123, штаммов *Y. enterocolitica* серовара O9 №Н-383, *Y. pseudotuberculosis* O1 №2841, а также раствор полисахарида, выделенного из *Y. pestis* штамма K1 методом Вестфала. Кроме того, для контроля ингибиции применили предварительную экспозицию лимфоцитов с 0,85% раствором NaCl.

Дизайн данного опыта имеет следующие особенности:

1. Такая же ингибиция с использованием лимфоцитов иммунизированных кроликов параллельно выполнена с несенсибилизированными эритроцитами, не нагруженными F1 антигеном. Это позволяет проверить возможность ингибиции теми же препаратами неспецифического связывания.

2. Поскольку ранняя фаза антигенспецифического ответа на живую вакцину развивается интенсивнее, чем на инактивированную, аналогичная ингибиция связывания F1 реагента и несенсибилизированных эритроцитов проведена для лимфоцитов кроликов, иммунизированных живой и инактивированной формальдегидом вакциной. Это позволяет оценить специфичность F1 реагента и метода выявления ЛфР при разной интенсивности иммунного ответа.

3. Известно, что содержание ЛфР в пуле лимфоцитов меняется в динамике ранней фазы антигенспецифического ответа [1]. Поэтому вышеописанная ингибиция выполнена с лимфоцитами иммунизированных кроликов, выделенных из крови через 4 и 7 дней после иммунизации. Это дает возможность выяснить, не меняется ли специфичность метода в зависимости от изменения содержания в крови ЛфР.

4. На ряде экспериментальных моделей иммунизации и при вакцинации людей показано, что иммуномодуляция активирует не только эффекторную, но и раннюю фазу адаптивного иммунного ответа [4,

5]. Важно выяснить, не меняется ли в результате специфичность выявления ЛфР. Поэтому описанная ингибция проведена на лимфоцитах кроликов, иммунизированных одновременно с введением полиоксидония или беталейкина и 0,85% раствора NaCl (контрольные кролики).

Протоколы проведения опытов были рассмотрены и одобрены на заседаниях биоэтических комиссий Научного центра гигиены и эпидемиологии им. Х. Жуматова (Алматы, протокол №2) и Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева (Алматы, протокол №3-8).

В работе использовали живую чумную вакцину EV производства Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций, фиксированные ацетальдегидом эритроциты быка [6], риванол для конъюгации антигена F1 с фиксированными эритроцитами [7], культуры иерсиний – штаммы *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*; полисахарид *Y. pestis*; антиген F1, полученный по методу E.E. Baker [8]; реактивы – формалин, фиколл 400, верографин, этанол, метиленовый синий.

В работе применили различные варианты статистического сравнения серий (Стьюдента, Сукхатме, частотного анализа).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Относительное содержание ЛфР в суспензии изолированных из крови лимфоцитов показано в таблице 1.

**Таблица 1.** Содержание ЛфР, специфичных к F1, после иммунизации живой и инактивированной чумной вакциной без и с иммуномодуляцией

**Table 1.** Numbers of LfR specific for F1 after immunisation with live and inactivated plague vaccine with or without immunomodulation

Иммунизация вакциной EV Immunization by a vaccine EV	Дни после иммунизации Days after immunazation	Относительное содержание ЛфР после иммунизации, %**		
		LfR relative content, % after immunization**		
		без иммуномодуляции without immunomodulation	с полиоксидонием with polyoxidonium	с беталейкином with betaleukin
живой live	4	3.21±0.15	6.86±0.14	5.79±0.11
	7	5.29±0.16	10.36±0.13	6.93±0.20
инактивированной* inactivated*	4	2.21±0.11	5.57±0.14	4.93±0.16
	7	3.93±0.13	10.71±0.24	5.50±0.14

\*Взвесь инактивированной формальдегидом вакцины EV  
 \*\*Средняя и ее среднеквадратическая ошибка.  
 \*Suspension of inactivated by formaldehyde vaccine EV  
 \*\*Middle and her middle quadratic error

Видно, что инактивация вакцины EV в целом существенно уменьшает содержание этих лимфоцитов после иммунизации, то есть ослабляет иммуногенные свойства вакцины на раннем этапе адаптивного ответа. Так, в отсутствие иммуномодуляции содержание ЛфРс в случае инактивированного иммуногена через 4 дня после его введения снижается, по сравнению с эффектом живой вакцины, на 31, а через 7 дней – на 24%. При сочетании иммунизации с введением беталейкина этот показатель уменьшается соответственно на 15 и 21%. Аналогичный результат получен через 4 дня после иммунизации, выполненной параллельно с полиоксидонием – содержание ЛфРс снизилось на 19%. Анализ показал, что при проведении иммунизации параллельно с иммуномодуляцией ослабление активности иммуногена в этот срок оказалось достоверно менее выражено ( $P < 0,02$  при использовании беталейкина и  $P < 0,05$  при использовании полиоксидония), чем в отсутствие иммуномодуляции. Между компенсацией сниженной иммуногенной активности обоими препаратами иммуномодуляторов в этот срок исследования различие не выявлено ( $0,2 > P > 0,1$ ). Однако, хотя в отсутствие иммуномодуляции и при применении беталейкина через 7 дней после иммунизации ситуация принципиально не изменилась (за счет инактивации вакцины содержание ЛфРс уменьшилось на 24 и 21% соответственно), при параллельном с иммунизацией введении полиоксидония в этот срок негативный эффект инактивации иммуногена вообще не проявился. Подобный эффект иммуномодуляторов, например, полиоксидония, конъюгированного с антигеном, ранее детально изучен в отношении эффекторной фазы адаптивного ответа [9]. Полученные данные показывают, что этот эффект проявляется и в раннюю фазу его

развития даже при параллельном с иммуногеном введении иммуномодуляторов в несвязанном с последним состоянии.

Располагая данными о формировании ЛфР в ответ на иммунизацию иммуногенами по разным схемам, можно определить интенсивность ингибиции различными антигенами взаимодействия этих клеток с различными антигенами. На основании экспериментальных результатов рассчитывали степень ингибиции – относительный показатель снижения за счет экспозиции с антигеном количества выявляемых ЛфР в суспензии лимфоцитов.

$$СИ = -100 - (\text{исхЛфР} - \text{эксЛфР}) / \text{исхЛфР} \cdot 100,$$

где исхЛфР – исходное, до экспозиции с антигеном, содержание ЛфР в анализируемой пробе;  
эксЛфР – выявленное в пробе после экспозиции с ингибитором содержание ЛфР.

В таблице 2 приведены обобщенные результаты определения степени ингибиции гомологичным антигеном – инактивированной суспензией *Y. pestis*. Этот показатель при разных схемах опыта колеблется в пределах 7-86%. Столь широкий диапазон определяется тем, что в одинаковых условиях экспозиции лимфоцитов с ингибитором при одном и том же антигене-ингибиторе и одной и той же его дозе степень ингибиции зависит от количества ЛфР в суспензии лимфоцитов (чем оно меньше, тем больше при прочих равных условиях окажется степень ингибиции). Ранее показано, что содержание ЛфР в динамике ранней фазы адаптивного ответа на живую чумную вакцину, как и на любые другие иммуногены [1], имеет экстремальный характер [2].

**Таблица 2.** Ингибиция гомологичным антигеном\* взаимодействия ЛфР с F1 реагентом при различных условиях иммунизации чумной вакциной

**Table 2.** Inhibition of LfR and F1 interaction by a homologous antigen using different conditions for immunisation with plague vaccine

Иммунизация вакциной Immunization by vaccine	Степень ингибиции, Дни после иммунизации Days after immunazation	Степень ингибиции при иммунизации, % ** Degree of inhibition at immunization, % **		
		без иммуномодуляции without immunomodulation	с полиоксидонием with polyoxidonium	с бета лейкоцином with betaleukin
живой live	4	23.6±3.6	6.9±2.9	52.1±1.8
	7	36.6±1.8	52.5±1,6	64.9±1.1
инактивированной* inactivated*	4	85.7±5.5	66.1±3.0	69.5±3.8
	7	61.9±3.1	74.6±1.3	75.8±1.9

\*Взвесь инактивированной формальдегидом вакцины EV  
\*\*Содержание ЛфР после ингибиции по отношению к содержанию ЛфР до ингибиции, %.  
\*Suspension of inactivated with formaldehyde vaccine EV;  
\*\*LfR content after inhibition /LfR content before inhibition, %

Приведенные в таблице 2 данные показывают, что при любой схеме опыта иммунизация инактивированной вакциной обеспечивает существенно (P<0,001) большую степень ингибиции взаимодействия сформированных ЛфР с гомологичным антигеном, чем иммунизация живой вакциной. Это обусловлено тем, что инактивация вакцины приводит к уменьшению ее иммуногенной активности на раннем этапе адаптивного ответа, а при меньшем содержании ЛфР и прочих равных условиях степень ингибиции увеличивается.

В целом ингибиция гомологичным антигеном взаимодействия ЛфР с разработанным иммунореагентом является важным результатом, демонстрирующим его специфичность. Не менее важно проверить возможность ингибиции такого взаимодействия гетерологичными антигенами. В качестве таковых для обеспечения наиболее жестких условий проверки специфичности выбраны суспензии двух видов родственных иерсиний – *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, а также два продукта, полученные из гомологичных *Y. pestis*–суспензия инактивированных клеток дефектного по F1 антигену штамма *Y. pestis* и раствор липополисахарида, выделенного из *Y. pestis*, в концентрации 200 мкг/мл. Суспензии бактерий для ингибиции использовали в той же концентрации, что и взвесь инактивированных бактерий вакцины EV. Полученные результаты приведены в таблице 3.

**Таблица 3.** Степень ингибции гетерологичными антигенами взаимодействия ЛфР, специфичных к F1 *Y. pestis*, и F1 реагент при иммунизации без и с иммуномодуляцией

**Table 3.** Degree of inhibition by heterologic LfR antigens specific for F1 of *Y. pestis* and F1 reagent after immunisation with and without immunomodulation

Иммунизация вакциной EV Immunization by EV vaccine	Иммуномодуляция Immunomodulation	Дни после иммунизации Days after immunization	Степень ингибции гетерологичным антигеном, % Degree of inhibition by heterological antigen, %			
			<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	дефектный по F1 штамм <i>Y. pestis</i> imperfectly by F1stamm <i>Y. pestis</i>	липополисахарид <i>Y. pestis</i> lipopolysaccharide <i>Y. pestis</i>
живой live	Без without	4	7.1±4.9	5.4±5.2	5.2±4.5	6.5±5.0
		7	-3.2±2.2	-2.0±2.6	7.6±2.5*	7.6±2.5**
	с полиоксидонием with polyoxidonium	4	-0.3±1.5	-1.5±1.9	1.9±2.0	2.9±1.6
		7	0.7±1.8	0.6±1.2	3.3±1.2**	1.3±0.9
	с беталейкином with betaleukin	4	-3.8±2.0	0±1.8	3.6±1.9	2.4±1.6
		7	0.6±1.8	-3.4±1.8	2.9±1.6	-1.0±1.8
инактивированной inactivated	Без without	4	5.4±2.8	4.8±3.2	-1.2±4.4	7.1±3.8
		7	8.9±5.0	8.9±3.3	3.2±2.2	1.4±1.4
	с полиоксидонием with polyoxidonium	4	5.0±2.2*	6.2±2.3**	6.4±2.4**	6.1±2.3**
		7	1.2±1.3	1.9±1.0	3.2±1.2**	1.4±1.3
	с беталейкином with betaleukin	4	1.2±1.2	5.1±4.0	6.7±2.5**	5.2±2.3*
		7	0.0±0.0	2.4±1.6	3.6±1.9	2.4±1.6
*P<0,05; **P<0,02						
*P<0,05; **P<0,02						

Всего вариантов ингибции в комплексном опыте с учетом различных схем испытания – 48. Только в 10 случаях из них (20,8±5,9%) удалось выявить небольшую ингибцию в пределах 3,2-7,6%. В остальных случаях статистически значимая ингибция не была определена. Характерно, что в большинстве (8 из 10) случаев небольшая ингибция вызвана дериватами *Y. pestis* – дефектным по F1 штаммом и полисахаридом, выделенным из *Y. pestis*. Очевидно, что в этих двух продуктах сохраняются следовые количества F1. Более редкие (2) случая небольшой ингибции суспензиями иерсиний двух других видов, по-видимому, обусловлены их таксономической близостью с *Y. pestis* и, следовательно, возможными антигенными связями.

Принципиально важно, что степень ингибции гомологичным антигеном взаимодействия ЛфР со специфическим иммунореагентом всегда существенно более высока, чем гетерологичными. Так, сравнение данных, приведенных в таблицах 2 и 3, показало, что при выявлении небольшой ингибции гетерологичными препаратами в 10 случаях ее степень в среднем оказалась меньше степени ингибции гомологичным антигеном в 11,8±1,7 раза (P<0,001).

Все определения ЛфР с использованием F1 иммунореагента и ингибции гомологичным антигеном их взаимодействия, в соответствии с дизайном комплексного эксперимента, сопровождались параллельными тестами с использованием контрольного реагента, не нагруженного антигеном F1. Результаты определения взаимодействия лимфоцитов из тестируемых суспензий с контрольным реагентом приведены в таблице 4.

**Таблица 4.** Содержание лимфоцитов, связывающих контрольный реагент, после иммунизации живой и инактивированной чумной вакциной без и с иммуномодуляцией

**Table 4.** Number of lymphocytes binding to the control reagent after immunisation with live and inactivated plague vaccine, with or without immunomodulation

Иммунизация вакциной EV Immunization by EV vaccine	Дни после иммунизации Days after immunization	Относительное содержание выявленных лимфоцитов после иммунизации*		
		Relative content of lymphocytes exposed after immunization*		
		без иммуномодуляции without immunomodulation	с полиоксидонием with polyoxidonium	с беталейкином with betaleukin
живой вакциной live vaccine	4	1.14±0.10	5.29±0.16	2.21±0.10
	7	1.86±0.10	3.43±0.16	1.07±0.07
инактивированной inactivated	4	0	4.43±0.14	2.21±0.12
	7	1.07±0.07	3.43±0.14	1.14±0.10
*Средняя и ее средняя квадратическая ошибка. *Middle and her middle quadratic error				

Видно, что во многих случаях такое взаимодействие, как и на других моделях иммунизации [5], было выявлено. Следующие характеристики этого взаимодействия обращают на себя внимание. При сравнении данных таблиц 1 и 4 обнаружено, что в каждый из двух дней выполнения тестов содержание ЛфР при любой схеме вакцинации и при применении жизнеспособного или инактивированного иммуногена всегда существенно ( $P < 0,001$ ) превышало показатель содержания лимфоцитов, прореагировавших с контрольным реагентом. В отсутствие иммуномодуляции и при применении полиоксидония инактивированная вакцина индуцировала меньшее, чем живая, формирование таких лимфоцитов. Однако при иммунизации с параллельным введением беталейкина живая и инактивированная вакцина в исследованные сроки вызвала одинаковое образование этих лимфоцитов. Полиоксидоний резко (в 1,8 – не менее чем 4,6 раза) стимулировал в оба исследованных срока формирование лимфоцитов, прореагировавших с контрольным реагентом, а беталейкин стимулировал такой ответ только через 4 дня после иммунизации. Через 7 дней после иммунизации беталейкин этот ответ на инактивированную вакцину не стимулировал, а на живую – даже подавлял в 1,7 раза ( $P < 0,001$ ).

Возможны различные объяснения взаимодействия лимфоцитов иммунизированных животных с контрольным реагентом. Во-первых, такое связывание могло бы развиваться, если один и тот же лимфоцит обладает рецепторами и к F1 антигену, и к носителю F1, то есть к контрольному реагенту. Ранее был выполнен эксперимент иммунизации смесью иммуногенов (вакцина АДС и инактивированные формальдегидом бактерии *Salmonella typhimurim*), то есть смесь дифтерийного и столбнячного анатоксинов и салмонеллезных антигенов O, H1 и H1,2). Иммунореагенты для выявления ЛфР в этом опыте готовили на различающихся при микроскопии различных по форме и величине эритроцитах быка и птиц. С их помощью пытались выявить связывание одним и тем же ЛфР любых из 10 возможных комбинации двух иммунореагентов различной специфичности. Было выяснено, что один активный лимфоцит связывает иммунореагент только одной специфичности [3]. Рассчитанная, по результатам этого опыта, вероятность связывания одним ЛфР иммунореагентов более одной специфичности оказалась менее 0,001. Это значит, что процесс формирования ЛфР клонирован, то есть ЛфР не может иммунологически связывать реагенты более одной специфичности.

Вторая возможность – неиммунологическое связывание, представляется маловероятной, так как это неспецифическое связывание, как показано на ряде других моделей, отсутствует до иммунизации [5]. Более того, как видно из данных таблицы 4, оно может стимулироваться иммуномодуляцией.

Третья возможность – наличие иммунологического неспецифического компонента в период развития ранней фазы адаптивного ответа. Развитие такого компонента в течение эффекторной фазы общеизвестно – увеличение продукции нормальных иммуноглобулинов. Неспецифический компонент выявлен при изучении динамики ранней фазы адаптивного ответа не только на антиген F1, но и на другие иммуногены [5]. Эта возможность представляется наиболее вероятной.

Анализ полученных результатов показал, что взвесью инактивированных *Y. pestis*, которая вызывала выраженную ингибицию взаимодействия ЛфРс – иммунореагентом, ни в одном из 12 вариантов схемы испытания (независимо от жизнеспособности иммуногена, иммуномодуляции и срока исследования после иммунизации) не ингибировала взаимодействие ЛфРн с контрольным реагентом лимфоцитов. Это является результатом строгой специфичности рецепторов ЛфР в отношении использованного иммуногена, то есть клонированности ЛфРс.

Как видно, специфичность определения ЛфР обеспечивается не только технологией приготовления иммунореактива, но и фундаментальной характеристикой ЛфР – клонированностью их формирования при иммунном ответе.

## ВЫВОДЫ

1. Применение разработанного F1 иммунореактива позволяет определять такие лимфоциты с рецепторами к антигену F1 чумных бактерий после иммунизации живой и инактивированной чумной вакциной без и с применением иммуномодуляции.

2. В опытах ингибции несорбированными гомологичным и рядом гетерологичных антигенов показана специфичность выявления лимфоцитов с рецепторами к F1реактиву.

3. На модели иммунизации кроликов живой чумной вакциной EV подтверждена клонированность лимфоцитов с рецепторами к иммуногену.

4. В период ранней фазы адаптивного ответа на вакцину EV в эксперименте обнаружено развитие незначительного неспецифического компонента иммунного ответа. Его развитие не препятствует специфичности определения лимфоцитов с рецепторами к иммуногену использованным методом с применением разработанного реактива.

## Финансирование

Работа выполнена в рамках гранта №640 от 15.04.2013 г. Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Каральник Б.В., Дерябин П.Н., Денисова Т.Г., Жунусова Г.Б., Березин В.Е. Антигенсвязывающие лимфоциты в динамике иммунного ответа на бактериальные, вирусные и аутоантигены // Известия МОН РК, Национальной Академии наук РК. Серия биологическая и медицинская. – Алматы. – 2001. – №5. – С.37-43.

2. Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Тугамбаев Т.И., Атшабар Б.Б., Закарян С.Б., Мельникова Н.Н. Влияние беталейкина на показатели антигенспецифического ответа в модельных опытах иммунизации животных живой чумной вакциной // Цитокины и воспаление. – СПб. – 2014. – Т. 13, №1. – С.57-62.

3. Каральник Б.В. Этиологическая диагностика инфекционных заболеваний – важный сектор лабораторной медицины // Лабораторная медицина. – Алматы. – 2014. – №1. – С.82-86.

4. Karalnik B.V., Denisova T.G. Immunomodulation and stages of antigen specific response on herpes antigens (Иммуномодуляция и стадии антигенспецифического ответа на герпетические антигены) // Medimond International Proceedings. – 2011. – P. 231-235.

5. Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Умбетбаева А.Т. Влияние иммуномодуляции на антигенспецифический и неспецифический компоненты раннего иммунного ответа на герпетическую вакцину в эксперименте // Family Health in the XXI Century. Proceedings of the XV International Science Conference. – Torremolinos, Spain – Perm., 2011. – P.212-213.

6. АС СССР 862919. Способ получения иммунореактива / Каральник Б.В., Лещинская Л.Ц. // Бюлл. изобретений. – 1981. – №34. – С.30.

7. Шамардин В.А., Каральник Б.В. Сенсибилизация эритроцитов иммуноглобулинами: методические рекомендации. – Алма-Ата, 1981. – 12 с.

8. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E., Meyer E., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. 1. The isolation and characterization of the soluble antigen of Pasterella pestis (Изучение иммунизации против чумы. 1. Изоляция и характеристика растворимого антигена Pasterella pestis) // J.Immunol. – 1952. – Vol. 68, №2. – P.131-145.

9. Петров Р.В., Хайтов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. – М., 2011. – 698 с.

## REFERENCES

1. Karalnik B.V., Deryabin P.N., Denisova T.G., Zhunusova G.B., Berezin V.E. Antigenbinding lymphocytes in the dynamics of the immune response to bacterial, viral and autoantigens [Antigen-binding lymphocytes in the dynamics of the immune response to bacterial, viral and autoantigens] *Izvestiya MON RK, Nazionalnoi akademii nauk RK. Seria biologicheskaya i medizinskaya*, Almaty, 2001, no 5, pp 37-43.

2. Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Karalnik B.V., Denisova T.G., Tugambayev T.I., Atshabar B.B., Zakaryan S.B., Melnikova N.N. Vliyanie betaleukina na pokazately antigenspecificeskogo otveta v modelnykh opytakh immunisazii zhivotnykh zhivoi chumnoi vaccinoy [The influence on performance Betaleukin antigen specific response in animal models immunization experiments live plague vaccine] *Cytokiny i vospaleniye*, 2014, vol.13, no.1, pp.57-62

3. Karalnik B.V. Etyologisheskija diagnostika infectionnyh zabolevany – vazhny sector laboratornoi mediciny [The etiological diagnosis of infectious diseases - an important sector of laboratory medicine] *Laboratornaya medicina* – Almaty, 2001, no 5, pp 82-86.
4. Karalnik B.V., Denisova T.G. Immunomodulation and stages of antigen specific respons on herpes antigens *Medimond International proceedings*. – 2011. – pp. 231-235.
5. Karalnik B.V., Denisova T.G., Umbetbayeva A.T. Vlyyanie immunomodulyacii na antigen specifisheskyi i nespecyfisheskyi komponenty rannego immunnogo otveta na gerpetisheskuy vakciny v expyrymente [Effect of immunomodulation in the antigen specific and nonspecific components of early immune response to a herpes vaccine at experiment] *Family Health in the XXI Century. Rocoedings of the XV International Science Conference*. – Torremolinos, Spain, Perm, 2011, pp. 212-213.
6. AS SSSR 862919. Sposob polyshenya immunoreagenta [ Method of immunologic reagent prepartion] Karalnik B.V., Leschynskay L.Z. *Bull. isobretenyi*, 1981no 34, p 30.
7. Schamardyn V.A., Karalnik B.V. Sensybilisaziya erythrocytov immunoglobulinami: metodicheskye rekomendacii, [Sensitization of erythrocyte with immunoglobulins: methodical recomendations] Almaty, 1981, p 12.
8. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E., Meyer E., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. 1. The isolation and characterization of the soluble antigen of Pasterella pestis. *J.Immunol*, 1952, Vol. 68, no2, pp. 131-145.
9. Petrov R.V., Haitov R.M. Immunogeny I vakciny novogo pokolenya. [Immunogens and new generation vaccines] Moscow, 2011, 698 p.

## **ОБА БАКТЕРИЯСЫНЫҢ КАПСУЛЬДІ АНТИГЕНІН БАЙЛАНЫСТЫРАТЫН ЛИМФОЦИТТЕРДІҢ ЕРЕКШЕЛІГІ ЖӘНЕ ОНЫ АНЫҚТАЙТЫН ИММУНОРЕАГЕНТ**

**Каральник Б.В.<sup>1</sup>, Жунусова Г.Б.<sup>1</sup>, Денисова Т.Г.<sup>1</sup>, Пономарева Т.С.<sup>2</sup>, Дерябин П.Н.<sup>2</sup>,  
Атшабар Б.Б.<sup>2</sup>, Туружанова А.А.<sup>1</sup>, Тугамбаев Т.И.<sup>2</sup>, Закарян С.Б.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Х. Жұматов атындағы Гигиена және эпидемиология ғылыми орталығы  
М.Мақатаев көш., 34, Алматы, 050002, Қазақстан*

<sup>2</sup>*М.Айқымбаев атындағы Қазақ карантиндік және зооноздық жұқпалар ғылыми орталығы  
Капальская көш., 14, Алматы, 050054, Қазақстан  
lbimvac@mail.ru*

### **ТҮЙІН**

Жұмыс мақсаты – оба бактерияларының доминантты антигеніне рецепторлары (ЛФР) бар лимфоциттерді анықтау үшін дайындалған имунореагенттің ерекшелігін талдау және ЛФР ерекшелігін анықтау. Жұмыста қояндар, иммуногендер – тірі және инактивацияланған EV оба вакциналары, ЛФР және имунореагент пен өзара әрекеттесуінің ингибиторлары – инактивацияланған иерсиниялар суспензияларының 3 түрі (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*), F1 антигендері және оба бактрияларының липополисахариді, иммуномодуляторлар – беталейкин (1 бета рекомбинантты интерлейкині) және полиоксидоний қолданылды. ЛФР және оның әр түрлі антигендермен ингибициясын анықтау үшін жасушалық адгезия әдісі қолданылған. Тәжірибеде жасалынған имунореагентті қолданғанда ЛФР анықтаудың ерекшелігі гомо- және гетерологиялық антигендердің ингибициясы бойынша дәлелденген. Оба вакцинасының имунизациясы үлгісінде ЛФР клондығы және адаптивті жауаптың ерте сатысындағы ерекше емес әлсіз байқалатын компоненттің жауабының дамуы расталған. Ерекше емес әлсіз компоненттің дамуы дайындалған имунореагенттің ерекшелігін ғана емес, сонымен бірге ЛФР клондығымен шартталған ЛФР ерекшелігін айқындауға кедергі келтірмейді.

**Негізгі сөздер:** оба, адаптивті жауаптың ерте сатысы, имунореагент, ерекшелік.