

УДК 615.47:621.373.826; 576; 579.61; 616-006

© С. Б. Оникиенко¹, А. В. Земляной², Ю. И. Листопадов¹, В. И. Попов¹, А. С. Свистов¹, А. В. Чумаков¹, Б. А. Маргулис³, Г. А. Баранов⁴, В. К. Бородавко⁵, А. В. Смуров⁵, 2014

¹Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

²Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека, Ленинградская обл., Всеволожский р-н

³Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

⁴ОАО «Научно-исследовательский институт электрофизической аппаратуры им. Д. В. Ефремова», Санкт-Петербург

⁵Научно-исследовательский институт кораблестроения и вооружения ВМФ ВУНЦ ВМФ ВМА, Санкт-Петербург
onikisb@yandex.ru

РАЗРАБОТКА ИННОВАЦИОННЫХ СТРАТЕГИЙ ПЕРЕКРЕСТНОЙ ЗАЩИТЫ ВОЕННОСЛУЖАЩИХ КОРАБЕЛЬНОГО СОСТАВА И БЕРЕГОВЫХ ЧАСТЕЙ ВМФ ОТ РАДИАЦИОННЫХ, ТОКСИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ И БИОПАТОГЕНОВ

Разработаны новые средства защиты от радиационных, токсических воздействий и биопатогенов на основе белков теплового шока (БТШ70) и нетоксичных производных бактериальных липополисахаридов (ЛПС). Предложена стратегия стресс-ксенобиотерапии. Показан защитный эффект продуктов стресс-активации дрожжевых культур. Получены лазерные адъюванты вакцин на основе мобилизации эндогенных БТШ70 при лазерной обработке кожи в зоне введения вакцины. БТШ70, их конъюгаты с полиэтиленгликолем (БТШ70-ПЭГ) и гибридный белок на основе БТШ70 и Fc-фрагмента IgG (БТШ70-Fc) являются актопротекторами. Это перспективные средства защиты от экстремальных патогенных воздействий военнослужащих корабельного состава и береговых частей ВМФ.

Ключевые слова: защита от экстремальных патогенных воздействий, белки теплового шока, адъюванты вакцин, актопротекторы.

Стресс-факторы малой интенсивности запускают реакции «перекрестной защиты» от экстремальных патогенных воздействий, активируют рецепторы врожденного иммунитета (TLR) [1, 2]. Микробные ЛПС и БТШ70 активируют TLR, натуральные киллеры и являются адъювантами вакцин [3, 4]. Средства перекрестной защиты от родственных штаммов биопатогенов получены при экспонировании общих для них скрытых антигенных детерминант путем физической модификации микроорганизмов [5]. Импульсные физические воздействия высокой интенсивности вызывают мобилизацию эндогенных БТШ70 без развития необратимых повреждений клеток [6—8]. Разработаны стратегии радиационной, химической и биологической защиты, на основе применения нетоксичных производных ЛПС, мобилизации эндогенных БТШ70, применения их производных с расширенным спектром фармакологической активности.

Материалы и методы. Для модификации ЛПС, биопатогенов, активации дрожжевых культур и мобилизации эндогенных БТШ70 в клетках животных применяли лазерные установки мощностью излучения в диапазоне 10 Вт—15 кВт в видимом и инфракрасном свете, широкоапертурный ускоритель электронов на 190 кэВ. Защитный эффект продуктов лазерной активации дрожжевой культуры (ПЛАДК), модифицированных липополисахаридов (мЛПС), БТШ70 и их индукторов изучали на моделях радиационных, токсических поражений и действия биопатогенов на мышах линии СВА, BALB и С3Н/HeJ (без TLR4 рецепто-

ров). Радиационные поражения вызывали общим γ -облучением (5.5—10.0 Гр), токсические — интоксикацией циклофосфаном и фосгеном. Действие биопатогенов изучали на моделях геморрагического отёка легких, вызываемого заражением мышей вирусом гриппа H3N2, бактериального сепсиса (заражение культурой *B. Fragilis*) и эндотоксического шока (введение ЛПС *Serratia marcescens*). Влияние БТШ70 на показатели физической работоспособности при экстремальных физических нагрузках определяли по показателю максимального времени бега на тредбане «до отказа». БТШ70 вводили внутривентриально через 5 мин после завершения нагрузки. В крови определяли содержание КФК, ЛДГ, ИЛ6, ИЛ10. ПЛАДК применяли перорально в течение 28 сут после облучения (интоксикации циклофосфаном) или заражения мышей вирусом гриппа H3N2. мЛПС (0.1 ЛД₅₀) и БТШ70 (20—50 мкг) вводили за 30 мин до облучения (через 24 ч после интоксикации), затем ежедневно в течение 4 сут. Для защиты от сепсиса, эндотоксического шока и летальной гриппозной инфекции вводили мЛПС и БТШ70 за 1 ч до заражения (интоксикации). Критерием защитного эффекта ПЛАДК, мЛПС и БТШ70 служили выживаемость, продолжительность жизни после облучения (интоксикации), динамика массы тела, изменения гематологических показателей, иммунного статуса (CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD95+ клетки крови, РТМЛ с КонА, Г-КСФ, Э-КСФ, H3N2, H1N1, H5N1, антигенами и вакциной «Ваксигрип»). Оценивали изменения массы селезенки и содержание в ней БТШ70. Уровень цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа. Влияние лазерного излучения на эффективность вакцины «Ваксигрип» изучали при сочетании действия лазера на кожу ушной раковины мышей с внутрикожным введением вакцины. Для сравнения вводили 50 мкг БТШ70 в зону вакцинации. Параметры лазера на парах меди: длина волны 510, 578 нм; экспозиция 120—180 с; $P = 0.5—3.0$ Вт/см². Через 28 сут после вакцинации определяли титр противогриппозных антител, показатели клеточного иммунитета. В коже уха мышей, клетках и сыворотке крови определяли БТШ70. Число и активность клеток Лангерганса кожи определяли гистохимически и путем электронной микроскопии.

Результаты исследований

Модификация биомолекул физическими факторами высокой интенсивности и их применение в сочетании с БТШ70. Воздействие CO₂-лазера на капельную струю с полисахаридами исландского мха и морской травы *Zetraria* приводит к замещению высокомолекулярных на низкомолекулярные фракции. Хроматографические исследования с использованием белков-свидетелей показали, что обработка ЛПС пучком электронов 18—25 раз увеличивает содержание нетоксичных низкомолекулярных фракций, которые сохраняют иммуногенные свойства.

Защита от сепсиса и эндотоксического шока. Установлено, что мЛПС защищает мышей линии СВА от микробного сепсиса и эндотоксического шока. Защитный эффект экзогенного БТШ70 в 1.5 раза выше, чем мЛПС, он значительно усиливается при их совместном применении. Отсутствие гибели мышей линии С3Н/HeJ (без TLR4) после введения летальных доз микробных ЛПС свидетельствует об участии TLR4 в развитии эндотоксического шока и в механизмах реализации защитного эффекта мЛПС.

Защита от поражений при воздействии токсических веществ. При поражении фосгеном мЛПС и БТШ70 повышают выживаемость животных и уровень ИЛ10, снижают ИЛ6 и выраженность токсического отека легких. При этом коэффициент ИЛ-6/ИЛ-10 снижается более чем в 8 раз. Это свидетельствует о том, что в механизме защитного действия мЛПС и БТШ70 при токсическом отеке легких важную роль играют противовоспалительные реакции.

Противовирусная защита. Выявлен защитный эффект мЛПС и БТШ70 при летальной гриппозной вирусной инфекции (H3N2) у мышей. При совместном применении мЛПС и БТШ70 защитный эффект был наиболее выражен.

Противорадиационная защита. Оценка защитных свойств мЛПС и БТШ70 при общем γ -облучении и интоксикации циклофосфаном показала, что у животных, получавших мЛПС за 30 мин до облучения в дозе 10 Гр, выживаемость составила 72, БТШ70 — 61, сочетания мЛПС и БТШ70 — 93 %. При острой интоксикации циклофосфаном у мышей, полу-

чавших мЛПС, выживаемость была 61, БТШ70 — 56, сочетание мЛПС с БТШ70 — 93 %. При хронической интоксикации циклофосфаном — 56, 61 и 67 % соответственно. Все животные в контрольных группах погибли.

Установлено, что изолированный прием мЛПС и БТШ70 препятствовал развитию лейкопении на 7 и 14 сутки наблюдения после облучения в дозе 6.5 Гр, острой и хронической интоксикации циклофосфаном. Максимальный защитный эффект отмечен при сочетанном применении мЛПС и БТШ70. Снижение числа CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, а также повышение Т-клеток с признаками апоптоза (CD95+) свидетельствуют о том, что общее γ -облучение, острая и хроническая интоксикация циклофосфаном снижают число клеток-эффекторов иммунной системы. мЛПС и БТШ70 препятствуют развитию миелосупрессии и иммунных нарушений, особенно при их сочетанном применении.

Результаты РТМЛ с ЛПС, Г-КСФ, Э-КСФ свидетельствуют о том, что при общем γ -облучении, острой и хронической интоксикации циклофосфаном происходит десенсибилизация TLR4, рецепторов Г-КСФ, Э-КСФ. Общее γ -облучение в дозе 6.5 Гр, острая и хроническая интоксикация циклофосфаном приводят к уменьшению массы селезенки. мЛПС и БТШ70 препятствуют снижению массы селезенки, развитию миелосупрессии и иммунных нарушений, повышают выживаемость мышей при воздействии общего γ -облучения, острой и хронической интоксикации циклофосфаном. Защитный эффект усиливается при сочетанном применении мЛПС и БТШ70. Одним из механизмов этого эффекта является активация TLR4 и повышение чувствительности рецепторов ГКСФ и Э-КСФ к эндогенным активаторам.

Актопротекторное действие рекомбинантного БТШ70. Экстремальные физические нагрузки снижают более чем на 60 % показатели физической работоспособности через 5—10 сут после начала эксперимента, а также значительно повышают уровень КФК, ЛДГ, ИЛ6, ИЛ10 в крови у крыс. Это свидетельствует о повреждении клеточных мембран миоцитов при экстремальных физических нагрузках и указывает на роль провоспалительных цитокинов в их развитии. Установлено, что БТШ70 является актопротектором. Он не только предотвращает снижение работоспособности при экстремальных физических нагрузках, но повышает их более чем на 26 % в сравнении с исходными показателями. Актопротекторный эффект БТШ70 носит дозозависимый характер.

Производные БТШ70 пролонгированного действия (БТШ70-ПЭГ) также являются актопротекторами. Их активность сравнима с немодифицированным БТШ70. Они повышают более чем на 25 % работоспособность крыс при экстремальных физических нагрузках. БТШ70 и БТШ70-ПЭГ, снижают уровень КФК и ЛДГ, ИЛ6 при сохранении повышенного уровня ИЛ10, восстанавливают баланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, препятствуют развитию повреждений мышц, повышают устойчивость к экстремальным физическим нагрузкам и препятствуют развитию рабдомиолиза.

Морфологический анализ выявил в биоптатах мышц всех групп экспериментальных животных признаки дистрофии, рабдомиолиза и асептического воспаления. В мышцах крыс основных групп обнаружены признаки активации ангионеогенеза и лимфокапиллярной системы с присутствием в лимфокапиллярах большого количества светлых, с большой цитоплазмой «больших», «широкоцитоплазменных» лейкоцитов, что было наиболее выражено в группах получавших БТШ70-ПЭГ. Выявлена мобилизация сателлитных клеток мышц, которая была наиболее выражена в группе животных, получавших БТШ70-ПЭГ. Весь спектр выявленных морфологических изменений свидетельствует о том, что БТШ70 и БТШ70-ПЭГ активируют репаративные процессы в поврежденных при экстремальных физических нагрузках миоцитах. Результаты морфометрии биоптатов свидетельствуют о том, что БТШ70, БТШ70-ПЭГ увеличивают плотность капиллярной сети мышц (в 1.7—3.3 раз) по сравнению с показателями группы контроля, а также повышает число сателлитных клеток мышц (в 6.8—8.4 раз).

Стресс-активация клеток импульсными воздействиями физических факторов высокой интенсивности. Параметры физических воздействий, необходимые для активации микроорганизмов и клеток многоклеточного организма с целью получения средств защиты от радиационных, токсических поражений и биопатогенов должны быть высокоинтенсивны-

ми, чтобы вызвать универсальную защитную реакцию клеточного стресса (гормезис), но кратковременными (импульсными), чтобы не вызывать летальных повреждений клеток. Этим требованиям соответствуют импульсно-периодическое излучение лазера с пиковой мощностью 1—10 кВт, пучок электронов в импульсном режиме (широкоапертурный ускоритель, 190 кэВ).

Установлено, что облучение CO₂-лазером дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae* (0.5—1 кВт/см²) вызывает секрецию в культуральную среду защитных белков стресса и повышение уровня БТШ70 более чем в 5 раз. Выявлен защитный эффект ПЛАДК при общем γ -облучении, субхронической интоксикации электрофильными соединениями (циклофосфан). Профилактический прием ПЛАДК при общем γ -облучении в дозе 5,5 Гр достоверно повышает выживаемость животных (до 93 %). ПЛАДК предотвращает вызываемые общим γ -облучением и хронической интоксикацией циклофосфаном нарушения аэробных и анаэробных механизмов энергообеспечения лейкоцитов (СДГ и ЛДГ), развитие недостаточности клеточного иммунитета (РТМЛ с КонА, ЛПС и Г-КСФ), активацию перекисных процессов (НСТ-тест), защищает клетки от повреждения ферментами лизосом (ЛКТ-тест). При хронической интоксикации циклофосфаном ПЛАДК в 1.52—1.74 раза ($p \leq 0.05$) повышает выживаемость мышей. Результаты исследования свидетельствуют о перспективности применения ПЛАДК для защиты организма человека от радиационных и токсических поражений.

Это послужило основой концепции стресс-ксенобиотерапии — активации ксеногенных по отношению к защищаемому организму импульсными воздействиями физических факторов высокой интенсивности, которые вызывают их обратимое повреждение. Продукты их стресс-активации протезируют нарушенные механизмы защиты от экстремальных патогенных воздействий. При этом происходит мобилизация эндогенных БТШ70 в результате импульсного воздействия пучка электронов и излучения лазера на дрожжевую культуру *Saccharomyces cerevisiae*.

Инновационные технологии повышения эффективности вакцин. Установлено, что экзогенный БТШ70, а также лазерная активация его секреции клетками кожи повышают эффективность противогриппозной вакцины Ваксигрип у мышей. Эффект наиболее выражен при одновременном внутрикожном введении вакцины и экзогенного БТШ70, а также при сочетании введения вакцины с лазерным облучением кожи в зоне инъекции. При введении мЛПС и БТШ70 в сочетании с вакциной получен максимальный адъювантный эффект. Выявлена прямая зависимость целевого эффекта от экспозиционной дозы лазерного излучения. Лазерное воздействие является эффективным адъювантом противогриппозной вакцины. Энергия импульса лазера достигает 12—20 кВт, при этом необратимого повреждения клеток кожи не наступает из-за короткой продолжительности (10—12 нс) и высокой частоты импульсов (5—15 кГц). Высокоинтенсивное воздействие лазера на кожу вызывает выраженную активацию клеток, которая сопровождается значительным повышением содержания внеклеточного БТШ70 в эпидермисе.

По данным РТМЛ у мышей, иммунизированных Н3N2-антигеном, который был модифицирован пучком электронов (100—150 кГр) выявлен перекрестный клеточный иммунный ответ на Н5N1 и Н1N1-антигены. Модификация вирусных антигенов с применением лучевых технологий может быть основой для получения средств перекрестного иммунного ответа, например, универсальных противогриппозных вакцин.

Выявлено, что лазерное облучение кожи уха мышей вызывает дозозависимое увеличение содержания внеклеточного БТШ70. Сочетание воздействия вакцины и БТШ70 значительно повышает ее эффективность. Адъювантный эффект БТШ70 усиливается при его комбинированном применении с мЛПС при вакцинации. Воздействие лазера на поверхность кожи в области вакцинации дозозависимо повышает эффективность гуморального ответа на противогриппозную вакцину. Введение экзогенного БТШ70 вызывает аналогичный эффект.

Литература

1. Меерсон Ф. З. Адаптационная медицина: Защитные перекрестные эффекты адаптации. М., 1993. 421 с.

2. Vijay-Kumar M., Aitken J. D., Sanders C. J., Frias A., Sloane V. M., Xu J., Neish A. S., Rojas M., Gewirtz A. T. Flagellin Treatment Protects against Chemicals, Bacteria, Viruses, and Radiation // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 8280—8285.
3. Fang H., Wu Y., Huang X., Wang W., Ang B., Cao X., Wan T. TLR4 is essential Hsp70-like protein 1 (Hsp70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286, N 32. P. 26267—26282.
4. Алекперов Э. А. Продукция и эффекты внеклеточных БТШ70 в популяциях иммунокомпетентных клеток: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2009. 27 с.
5. Furuya Y., Chan J., Regner M., Lobigs M., Koskinen A., Kok T., Manavis J., Li P., Müllbacher A., Alsharifi M. Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by {gamma}-irradiated influenza A viruses // *J. Virol.* 2010. V. 84, N 9. P. 4212—4221.
6. Morotomi-Yano K., Yano Kenichi. Nanosecond Pulsed Electric Fields as a Novel and Unique Tool for Quick and Efficient Induction of Stress Responses in Human Cells // 83 Annual Meeting of Jap. Biochem. Soc., Dec 7. 2010. P. 283—284.
7. Kruse D. E., Mackanos M. A., O'Connell-Rodwell C. E., Contag C. H., Ferrara K. W. Short-duration-focused ultrasound stimulation of Hsp70 expression in vivo // *Phys. Med. Biol.* 2008. V. 53, N 13. P. 3641—3660.
8. Yamasaki A., Ito H., Yusa J., Sakurai Y., Okuyama N., Ozawa R. Expression of heat shock proteins, Hsp70 and Hsp25, in the rat gingiva after irradiation with a CO₂ laser in coagulation mode // *J. Periodontal. Res.* 2010. V. 45, N 3. P. 323—330.

Статья поступила в редакцию 24.03.2014 г.



S. B. Onikiyenko¹, A. V. Zemlyanoi², Yu. I. Listopadov¹, V. I. Popov¹, A. S. Svistov¹, A. V. Chumakov¹,
B. A. Margulies³, G. A. Baranov⁴, V. K. Borodavko⁵, A. V. Smurov⁵

¹Military-Medical Academy, St.-Petersburg

²Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Leningrad Region

³Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg

⁴Join Stock Company «D. V. Efremov Institute of Electrophysical Apparatus», St.-Petersburg

⁵1-st Central Research Institute (Naval Shipbuilding) DoD, St.-Petersburg

The Development of Innovative Strategy of Cross Protection of the Military Personnel of Ship Structure and Coastal Parts of the Navy from Radiation, Toxic Influences and Biopathogens

New means of protection from radiation, toxic influences and biopathogens on the basis of heat shock proteins 70 (Hsp70) and nontoxic derivatives of bacterial lipopolysaccharides (LPS) are developed. Strategy of a stress-xenobiotherapy is offered. The protective effect of a stress activation products of yeast cultures is shown. Laser adjuvants of vaccines on the basis of mobilization of endogenous Hps70 are received at laser processing of skin in a zone of vaccine introduction. Hps70, their conjugates with polyethyleneglycol (Hsp70-PEG) and hybrid protein on the basis of Hps70 and Fc-fragment of IgG (Hps70-Fs) are actoprotectors. These are perspective means of protection of the military personnel of ship structure and coastal parts of the Navy from extreme pathogenic influences.

Key words: protection against extreme pathogenic influences, proteins of thermal shock, adjuvants of vaccines, aktoprotektor.