

4. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания. М.: Информационно-издательский центр Минздрава России; 1998. 128 с.
  5. Райхер Л.И., Райхер И.И., Фарцгейгер Н.И. и др., изобретатели. Способ получения иммобилизованного коммерческого пепсина. А.с. № 1730148 СССР, МКИ C12N11/14; 30.04.1992.
  6. Chen L., Tsao G. Chemical procedures for enzyme immobilization on porous cellulose beads. Biotechnol. Bioeng. 1977; 19 :1463–1473.
  7. Hong H., Rooijakkers E., Ke N. et al. Methods for the purification of equine rabies immunoglobulin: effects on yield and biological activity. Biologicals. 1994; 22 :1–6.
  8. Lang J., Attanath P., Quiambao B. et al. Evaluation of the safety, immunogenicity, and pharmacokinetic profile of a new, highly purified, heat-treated equine rabies immunoglobulin, administered either alone or in association with a purified, Vero-cell rabies vaccine. Acta Trop. 1998; 70:317–333.
  9. Lu J., Guo Z., Han W. et al. Preparation and development of equine hyperimmune globulin F(ab')<sub>2</sub> against severe acute respiratory syndrome coronavirus. Acta Pharmacol. Sin. 2005; 26 :1479–84.
  10. Puvanakrishnan R., Bose S. Immobilization of pepsin on sand: preparation, characterization and application. Indian J. Biochem. Biophys. 1984; 21:323–326.
  11. Samier F., Piot J.M., Guillochon D. et al. Stabilization of pepsin on duolite for continuous hydrolysis of bovine haemoglobin at pH 2 and 40 °C. Biotechnology techniques. 1993; 7(1):25–30.
  12. Tomono T., Suzuki T., Tokunaga E. Cleavage of human serum immunoglobulin G by immobilized pepsin preparation. Biochim. Biophys. Acta. 1981; 660:186–192.
  13. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. Geneva; 2004. 121 p.
- S. V.Generalov, E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, E.M.Hramkova, I.A.Shepelev, L.V.Savitskaya, L.N.Minaeva, M.V.Galkina, T.A.Miheeva, N.N.Kochkalova, M.N.Kireev

# **F(ab')<sub>2</sub>-Fragments of Antirabic Immunoglobulin Production Using Immobilized Pepsin**

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Biotechnological scheme for F(ab')<sub>2</sub>-fragments of anti-rabies immunoglobulin production using immobilized pepsin was developed. Optimal ways for immobilized pepsin production were determined, conditions for fermentative hydrolysis of anti-rabies immunoglobulin were sorted out. Protective properties of F(ab')<sub>2</sub>-fragments of anti-rabies immunoglobulin produced by means of this method were assessed.

**Key words:** rabies, anti-rabies immunoglobulin, F(ab')<sub>2</sub>-fragments, immobilized pepsin.

Поступила 27.05.08.

УДК 616.981.452

**В.И.Дубровина, Е.П.Голубинский, С.А.Витязева, Е.Ю.Марков, В.Б.Николаев, Т.А.Иванова, Ж.А.Коновалова, Т.Т.Шкаруба**

## **ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО АНТИГЕННОГО ПРЕПАРАТА *YERSINIA PESTIS* EV НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ФАГОЦИТАРНОЙ СИСТЕМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»*

Представлены результаты изучения влияния антигенных комплексов *Y. pestis* EV на функциональную активность клеток фагоцитарной системы морских свинок и белых мышей. Показано, что препарат, приготовленный на основе F1-антигена, мембранной фракции *Y. pestis* EV и иммуномодулятора – арабиногалактана лиственницы сибирской (АГ), вызывает повышение функциональной активности клеток фагоцитарной системы экспериментальных животных (морских свинок), усиливает адгезивную и поглотительную способности перитонеальных макрофагов, интенсивность выработки активных форм кислорода и монооксида азота; оказывает стимулирующий эффект на активность миелопероксидазы и синтез неферментных катионных белков полиморфноядерных лейкоцитов. Антигенный комплекс, приготовленный на основе F1-антигена, мембранной фракции *Y. pestis* EV и АГ, обладает стимулирующим действием на цитокининдуцирующую функцию макрофагов белых мышей, что выражается в усилении продукции цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, антигены, фракция 1 (F1), клеточные оболочки, фагоцитоз, неспецифическая резистентность.

Известно, что многие существующие противочумные вакцины, состоящие из убитых или аттенуированных клеток чумного микроба, недостаточно эффективны и способны вызывать поствакцинальные осложнения [3, 5, 15], поэтому разработка высокоэффективных и слабо реактогенных химических вакцин для специфической профилактики чумы весьма актуальна [1]. В связи с возникшей в последнее время угрозой биотерроризма и высокой вероятностью использования чумного микроба в качестве биологического оружия эта проблема приобретает особую значимость [5, 12].

Ранее нами сообщалось о возможности получения за счет обработки живых клеток *Yersinia pestis* EV раствором бактерицидного детергента цетавло-

на комплексного препарата на основе F1-антигена и мембранной фракции, обладающего высокой протективной активностью и иммунобиологическими свойствами в опытах на мышах [7]. Поскольку в механизмах резистентности к чуме важная роль отводится клеточным факторам, большой интерес при формировании поствакцинального иммунитета представляют структурно-функциональные изменения в клетках системы мононуклеарных фагоцитов. В связи с этим цель работы – изучение влияния на функциональную активность фагоцитов экспериментальных животных комплексного антигенного препарата, приготовленного на основе F1-антигена и мембранной фракции клеток *Y. pestis* EV в сочетании с иммуномодулятором – арабиногалактаном (АГ).

## Материалы и методы

Для извлечения F1-антигена и мембранной фракции – клеточных оболочек (КО) – использовали штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Культуру выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) в течение 48 ч при 37 °С, смывали забуференным физиологическим раствором. К полученной бактериальной взвеси (100 млрд м.к./мл) добавляли равный объем 0,0625 % раствора катионного детергента цетавлона (cetyltrimethylammonium bromide, «Serva»). Через 72 ч инкубации проводили контроль специфической стерильности. Обеззараженную бактериальную суспензию центрифугировали при 6000 об./мин (центрифуга ОС-6М, Россия) в течение 20 мин при 10 °С, освобождаясь от неразрушенных клеток. Фракцию клеточных оболочек получали центрифугированием супернатанта при 16000 об./мин (центрифуга K25D, Janetzki, Германия) в течение 30 мин на холоде. Для снижения токсичности КО обрабатывали 0,1 % раствором дезоксихолата натрия (2 мг/мл) при комнатной температуре в течение 10 мин, несколько раз отмывали дистиллированной водой и лиофильно высушивали. Из супернатанта выделяли F1-антиген методом изоэлектрического осаждения. Антигенный комплекс (F1+КО) получали путем механического смешивания F1-антигена и мембранной фракции клеток *Y. pestis* EV в соотношении 1:1 (по сухому весу).

Установлено, что этот антигенный комплекс при определенных дозах (62,5–7,8 мкг на мышь) защищает до 100 % белых мышей от последующего заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 2683 в дозе 200 LD<sub>50</sub>. Показано, что протективная активность комплексного препарата может быть усилена за счет использования иммуномодуляторов искусственного (мурамилдипептид) и естественного происхождения (арабиногалактан и бактериальная ДНК) [6, 7].

В качестве иммуномодулятора использовали АГ лиственницы сибирской, любезно предоставленный сотрудниками института химии СО РАН им. А.Е.Фаворского (Иркутск) [8].

Экспериментальной моделью служили морские свинки (300–350 г) и белые мыши (18–20 г). Животных выводили из эксперимента воздушной эмболией сосудов сердца в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Для изучения активности фагоцитов в отношении *Y. pestis* EV использовали переживающую однослойную культуру перитонеальных макрофагов морских свинок интактных и получивших подкожно только *Y. pestis* EV НИИЭГ (живая чумная вакцина – ЖЧВ) в дозе 10<sup>8</sup> м.к. (контроль), либо F1+КО (контроль) или F1+КО в сочетании с АГ (2 мг/кг) [7]. Для воспроизведения фагоцитоза *in vitro* клетки *Y. pestis* EV соединяли с фагоцитами в соотношении 50:1. Эффективность фагоцитоза оценивали по проценту активных макрофагов, фагоцитарному индексу и индексу завершенности фагоцитоза (ИЗФ). Об ак-

тивности кислородзависимого метаболизма (КЗМ) в фагоцитах судили по числу формазанположительных клеток и по степени восстановления тетразолия в диформазан (НСТ-тест) [13]. Интенсивность синтеза монооксида азота (NO) и, следовательно, активность NO-синтазы измеряли через 3 ч контакта фагоцитов с микробами при 37 °С и выражали в мкМ/10<sup>7</sup> фагоцитов [11].

Активность миелопероксидазы (МПО) и содержание неферментных катионных белков (НКБ) фагоцитов определяли цитофотометрически [9] и выражали в условных единицах. Влияние на продукцию цитокинов исследуемых препаратов изучали *in vivo*. Белых мышей иммунизировали *Y. pestis* EV (10<sup>5</sup> м.к.), F1+КО (по 15,6 мкг на мышь) или F1+КО (в той же дозе) в сочетании с АГ (40 мкг на мышь). Для контроля исследовали макрофаги интактных и обработанных иммуномодулятором (АГ – 40 мкг на мышь) мышей. Пробы макрофагов от животных отбирали на 3, 7, 14-е и 21-е сутки после вакцинации. Супернатант, содержащий комплекс цитокинов, получали по методу И.И.Долгушина и соавт. [4]. Цитокины интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-6 (ИЛ-6), фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) идентифицировали в иммуноферментном анализе с помощью моноклональных антител производства Caltag, Канада. Результаты реакции учитывали на приборе ELx808U при λ=490 нм (бланкирование проводили по суспензии макрофагов экспериментальных животных предварительно стимулированных АГ) и выражали в пг/10<sup>7</sup> клеток.

Статистическую обработку проводили общепринятыми методами, рассчитывая среднеарифметические величины, их средние ошибки, доверительный интервал [2].

## Результаты и обсуждение

При изучении влияния ЖЧВ, F1+КО, F1+КО+АГ на адгезивную способность перитонеальных макрофагов морской свинки показано, что все три препарата повышают адгезивную способность макрофагов по сравнению с интактными животными (рис. 1). На 14-е сутки наблюдения зарегистрирован рост индекса адгезии у макрофагов в группе животных, получивших F1+КО и F1+КО+АГ. По стимулирующему влиянию на адгезивную способность F1+КО и F1+КО+АГ достоверно (p≤0,05) превосходили ЖЧВ в этот срок наблюдения. Индекс адгезии у макрофагов животных, получивших F1+КО+АГ, был в 1,2 раза выше (p≤0,05) в сравнении с F1+КО. К 21-м суткам наблюдения значения индекса адгезии в обеих группах выравниваются, но остаются выше, чем у макрофагов иммунизированных ЖЧВ животных (рис. 1).

Как при сочетанном применении F1+КО с АГ, так и без него антигенные комплексы оказывают примерно равной выраженности стимулирующее действие (21-е сутки после введения препаратов) на поглотительную активность фагоцитов.

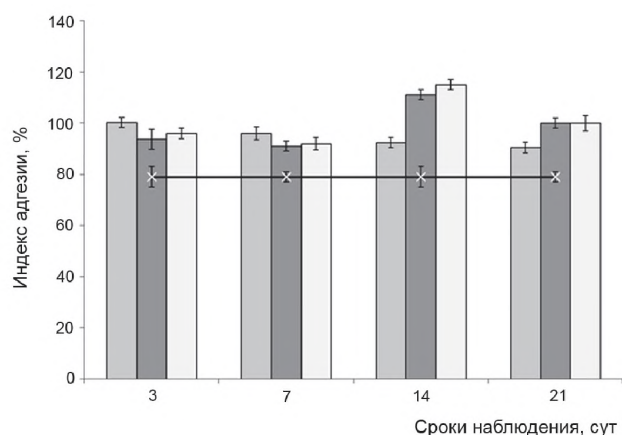


Рис. 1 Влияние живой чумной вакцины; F1+KO; F1+KO+AG на адгезивную способность перитонеальных макрофагов морской свинки при фагоцитозе *Y. pestis* EV:   
 ■ – ЖЧВ, ■ – КО+F1, □ – КО+F1+AG, × – АГ

Установлено повышение ИЗФ, свидетельствующего о качественном сдвиге (с  $-87,4 \pm 3,7$  до  $-32,7 \pm 3,2$  в случае F1+KO с АГ и  $-58,7 \pm 6,6$  – F1+KO) в процессе, определяющем судьбу чумного микроба в макроорганизме. Показатели цитопатического действия чумного микроба на макрофаги морских свинок, иммунизированных F1+KO в сочетании с АГ, были значительно ниже ( $4,2 \pm 0,1$  %), чем в других группах животных (F1+KO –  $15,5 \pm 0,2$  % и  $18,2 \pm 0,6$  % в случае живой чумной вакцины).

Судя по увеличению показателей НСТ-теста, антигенные комплексы усиливают выработку активных форм кислорода (АФК) на 14-е – 21-е сутки наблюдения (рис. 2).

Показано, что АГ в сочетании с антигенным комплексом стимулирует повышение выработки АФК перитонеальными макрофагами морской свинки в большей степени, чем при введении F1+KO, что способствует усилению кислородзависимого бактерицидного эффекта фагоцитов в отношении чумного микроба.

Антигенный комплекс, состоящий из F1+KO+AG,

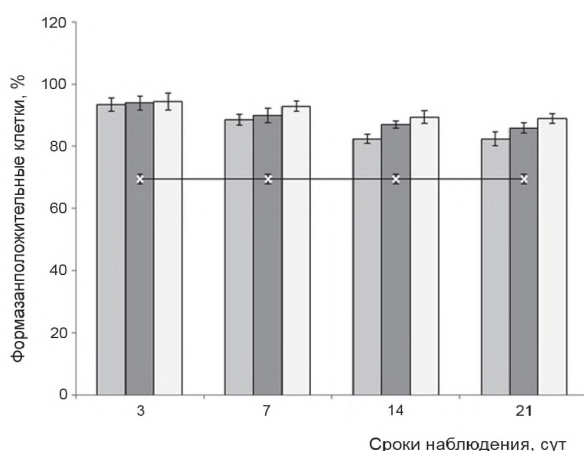


Рис. 2 Влияние живой чумной вакцины и антигенных комплексов на показатели НСТ-теста у нефагоцитирующих макрофагов морских свинок в динамике иммуногенеза ( $M \pm m$ , 30 мин):

■ – ЖЧВ, ■ – КО+F1, □ – КО+F1+AG, × – АГ

по интенсивности влияния на продукцию NO несколько превосходит F1+KO во все сроки наблюдения (3, 7, 14-е и 21-е сутки). Заметный прирост содержания NO наблюдается уже на 3-и сутки после иммунизации животных и сохраняется в последующие сроки ( $18,0 \pm 1,5$  мкМ/ $10^7$  фагоцитов, при  $p \leq 0,05$ ). При фагоцитозе чумного микроба значительного ингибирования синтеза монооксида азота перитонеальными макрофагами иммунизированных животных (F1+KO –  $12,6 \pm 1,4$  и F1+KO+AG –  $15,2 \pm 1,6$  мкМ/ $10^7$  фагоцитов) в отличие от показателей у макрофагов интактных морских свинок ( $5,2 \pm 0,4$  мкМ/ $10^7$  фагоцитов, при  $p \leq 0,05$ ) не наблюдается.

ЖЧВ, F1+KO и F1+KO+AG оказывают стимулирующее воздействие на активность МПО в нефагоцитирующих и фагоцитирующих чумной микроб полиморфно-ядерных лейкоцитах (ПЯЛ) в сравнении с интактными животными во все сроки наблюдения ( $p \leq 0,05$ ).

Отмечено, что ЖЧВ ( $57,0 \pm 0,4$ ) и F1+KO+AG ( $59,8 \pm 0,6$ ) обладают большим стимулирующим воздействием на активность МПО в нефагоцитирующих ПЯЛ по сравнению с F1+KO ( $55,0 \pm 0,1$ ) на 3-и сутки иммуногенеза ( $p \leq 0,05$ ). Активность фермента в ПЯЛ морских свинок, получивших F1+KO, возрастает с 7-х суток, достигая своего максимума на 14-е сутки ( $59,5 \pm 0,2$ ) с последующим снижением на 21-е сутки после введения антигенного комплекса.

Наибольшим стимулирующим воздействием на активность фермента обладает комплекс F1+KO+AG, что выражается в высоких по сравнению с остальными антигенами показателях активности МПО в нефагоцитирующих ПЯЛ на 3, 7-е и 21-е сутки иммуногенеза ( $p \leq 0,01$ ). На 14-е сутки после введения экспериментальным животным F1+KO, F1+KO+AG показатели активности МПО в гранулах нефагоцитирующих лейкоцитов практически не отличались, но были значительно выше, чем в контроле (ЖЧВ). Активность МПО у фагоцитирующих *Y. pestis* EV лейкоцитов животных, получивших F1+KO, F1+KO+AG, а также интактных была ниже, чем у нефагоцитирующих ( $p \leq 0,01$ ). В случае с ЖЧВ активность фермента как у нефагоцитирующих, так и у фагоцитирующих ПЯЛ не менялась.

Установлено, что ЖЧВ оказывает наиболее стимулирующее воздействие на накопление неферментных катионных белков в гранулах нефагоцитирующих лейкоцитов перитонеального экссудата в сравнении с F1+KO и F1+KO+AG на 3, 7-е и 14-е сутки иммуногенеза. F1+KO+AG и F1+KO по уровню содержания НКБ полиморфно-ядерные лейкоциты как фагоцитирующие *Y. pestis* EV, так и нефагоцитирующие клетки достигают максимальные значения (F1+KO+AG –  $61,2 \pm 0,1$ , F1+KO –  $52,1 \pm 0,1$ ), превышающие контрольные (ЖЧВ –  $50,8 \pm 0,4$ ) к 21-м суткам наблюдения, что свидетельствует о положительном влиянии исследованных антигенных комплексов на кислороднезависимые бактерицидные системы фагоцитов. Вместе с тем в ПЯЛ иммунизированных



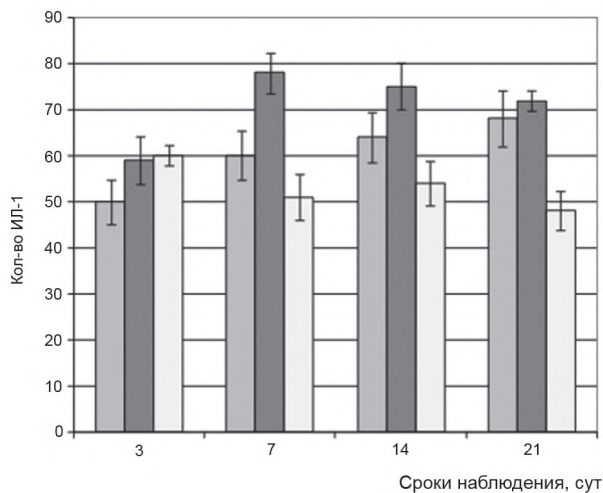


Рис. 3. Продукция интерлейкина-1 макрофагами белых мышей, иммунизированных живой чумной вакциной и антигенными комплексами:  
 ■ – KO+F1, ■ – KO+F1+AG, □ – ЖЧВ

морских свинок экзоцитоз неферментных катионных белков при поглощении чумного микроба происходит более активно, чем в лейкоцитах интактных животных.

В опытах *in vivo* показано, что ЖЧВ активирует синтез перитонеальными макрофагами белых мышей ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ . Характер воздействия на продукцию макрофагами ИЛ-1 антигенных комплексов при их введении животным представлен на рисунке (рис. 3).

Наиболее выраженный стимулирующий эффект как F1+КО, так и F1+КО+АГ в отношении ИЛ-1 отмечен на 7–21-е сутки ( $p \leq 0,01$ ) после иммунизации, причем F1+КО+АГ по степени активации продукции ИЛ-1 заметно превосходил F1+КО ( $p \leq 0,05$ ).

Стимулирующее действие исследованных антигенных комплексов на продукцию ИЛ-6 отмечено главным образом на 3-и сутки после иммунизации животных ( $p \leq 0,01$ ), к 7-м суткам оно заметно снижалось, а в последующие сроки было сопоставимым с контрольными значениями или даже уступало последним.

В отношении ФНО- $\alpha$  безусловным активирующим лидером является F1+КО+АГ, стимулирующая роль которого отмечалась во все сроки наблюдения. F1+КО по стимулирующей эффективности был сопоставим с F1+КО+АГ только в ранние (3 сут) сроки наблюдения.

Известно, что фагоцитоз играет ведущую роль в патогенезе чумы [5, 6, 14]. Основными факторами, лимитирующими эффективность фагоцитоза *Y. pestis*, являются ингибирующее влияние микроба на процесс слияния лизосом с фагосомами, процесс нормального высвобождения ФНО- $\alpha$  (и других цитокинов), инициация апоптоза макрофагов, дисбаланс окислительного метаболизма фагоцитов, устойчивость бактерий к лизосомальным ферментам фагоцитов и их способность после эндоцитоза покидать

фагосому, избегая губительного действия микробцидных факторов фагоцита [5, 6, 10]. Отсюда становится ясным, что для повышения эффективности иммунного ответа следует целенаправленно воздействовать на те звенья процесса, которые подвергаются наибольшему супрессивному давлению, т. е. на клеточное звено иммунитета [5, 6]. Поскольку специфические факторы, влияющие на резистентность макроорганизма, не всегда достаточно эффективны при чуме, определенные надежды возлагаются на использование искусственных антигенных комплексов, содержащих в своем составе неспецифические иммуностимуляторы фагоцитоза. Для этой цели перспективными в настоящее время признаны растительные арабиногалактаны. Особое внимание в этой связи привлекает АГ лиственницы сибирской, структура, физико-химические, фармакологические и иммуностимулирующие свойства которого достаточно подробно изучены [6, 8].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммунизация экспериментальных животных различными антигенными препаратами в сочетании с АГ лиственницы сопровождается стимуляцией реакций фагоцитов, ответственных за внутриклеточную инактивацию чумного микроба. Это нашло выражение в том, что комплексный препарат, приготовленный на основе F1-антигена, клеточных оболочек *Y. pestis* EV и АГ, повышает функциональную активность фагоцитов экспериментальных животных (морских свинок): усиливает адгезивную и поглотельную способности перитонеальных макрофагов, усиливает интенсивность выработки АФК и NO, оказывает стимулирующий эффект на активность миелопероксидазы и синтез неферментных катионных белков ПЯЛ.

Установлено, что в отношении макрофагов иммунизированных морских свинок цитопатический эффект чумного микроба выражен в меньшей мере, чем макрофагов интактных животных. Получены данные, свидетельствующие об активирующем действии антигенного комплекса на цитокининдуцирующую функцию перитонеальных макрофагов белых мышей, что выражалось в усилении продукции цитокинов ИЛ-1, -6, ФНО- $\alpha$ .

Таким образом, на основании результатов собственных исследований патогенетически обоснованы возможные механизмы биологического действия антигенного комплекса на основе субклеточных фракций *Y. pestis* EV, состоящего из F1-антигена и мембранной фракции чумного микроба как при изолированном применении, так и в сочетании с АГ на иммунокомпетентные клетки при их взаимодействии с чумным микробом.

Установленные в ходе экспериментов данные указывают на перспективность использования новых антигенных комплексов в качестве препаратов, повышающих неспецифическую резистентность против бактериальных патогенов. Это, учитывая ранее обнаруженную высокую протективную активность и

иммунобиологические свойства [7], свидетельствует о возможности их использования для конструирования высокоэффективных средств иммунопрофилактики чумы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Н.Ю. Конструирование вакцин нового поколения против сальмонеллез и чумы. Иммунология. 1997; 5:14–8.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Изд-во мед. л-ра; 1962. 180 с.
3. Дальвадянц С.М., Дятлов И.А., Еремин С.А., Кутырев В.В. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 1. Интегральные показатели противочумного иммунитета у белых мышей, привитых живой, инактивированной или химической вакциной. Пробл. особо опасных инф. 2003; 85:127–35.
4. Долгушин И.И., Зурочка А.В., Власов А.В. Секреторные продукты нейтрофилов и иммунный ответ. Иммунология. 1990; 3:35–7.
5. Домарадский И.В. Чума. М.: Наука; 1998. 148 с.
6. Дубровина В.И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности организма к возбудителям чумы, псевдотуберкулеза и туляремии (экспериментальное исследование) [дис. ... д-ра биол. наук]. Иркутск; 2004. 261 с.
7. Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Загоскина Т.Ю. и др. Протективная активность субклеточных фракций *Yersinia pestis* при экспериментальной чуме у белых мышей. Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. Иркутск, 2004; 2(1):123–7.
8. Медведева С.А., Александрова Г.П., Тюкавкина И.А. и др., изобретатели. Средство, обладающее противоанемической и иммуномодуляторной активностью. Патент РФ № 2208440 РФ, МПК А61 К 31/715, 33/26. Опубл. 20.07.03. Бюлл. № 20.
9. Пугаревский В.Е., Мазинг Ю.А. К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторно-диагностической практике. Лаб. дело. 1981; 10:579–82.
10. Cornelis G.R., Boland A., Boyd A.F. et al. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihist genome. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 1998; 62(4):1315–52.
11. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of

nitrate, nitrite and [ $^{15}\text{N}$ ] in biological fluids. Anal. Biochem. 1982; 126(1):131–8.

12. O'Brien K.K., Higdon M.L., Halverson J.J. Recognition and management of bioterrorism infections. Am. Fam. Physician. 2003; 67(9):1927–34.

13. Park B.H., Firkig S.M., Smithwick E.M. Infection and nitro-blue tetrazolium reduction by neutrophils: a diagnostic aid. Lancet. 1968; 2(7567):532–4.

14. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. Clin. Microbiol. Rev. 1997; 10(1):35–66.

15. Williamson E.D., Flick-Smith H.C., Lebutt C. et al. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens. Infect. Immun. 2005; 73(6):3598–3608.

V.I. Dubrovina, E.P. Golubinsky, S.A. Vityazeva, E.Yu. Markov, V.B. Nikolayev, T.A. Ivanova, Zh.A. Konovalova, T.T. Shkaruba

## Influence of the Complex *Yersinia pestis* EV Antigenic Preparation Upon the Functional Activity of the Phagocytic System Cells Under Experimental Conditions

Anti-Plague Research Institute for Siberia and the Far East, Irkutsk

Effects of *Y. pestis* EV antigenic complexes upon the functional activity of the phagocytic cells of guinea pig and white mice were assayed to demonstrate that the preparation constructed on the basis of the F1 antigen, *Y. pestis* EV membrane fraction and the Siberian larch arabinogalactane (AG) used as an immunomodulator, was able to increase the functional activities of the phagocytic system in test animals (guinea pigs), enhancing the adhesive and absorptive activity of the peritoneal macrophages and the intensity of active oxygen and nitrate monoxide production, as well as stimulating the activity of myeloperoxidase and the synthesis of non-enzyme cationic polymorphonuclear leucocytes. The antigenic complex prepared on the basis of the F1 antigen, *Y. pestis* EV membrane fraction and AG, was also shown to exert a stimulating effect on cytokine-inducing function of white-mouse macrophages expressed in the increased production of IL-1, IL-6 and FNO- $\alpha$  cytokines.

**Key words:** *Yersinia pestis*, antigens, Fraction 1 (F1), cell walls, phagocytosis, non-specific resistance.

Поступила 12.12.07.

## ДИАГНОСТИКА

УДК 616-073

Н.П. Коннов<sup>1</sup>, Ю.П. Волков<sup>2</sup>, М.Н. Киреев<sup>1</sup>, О.С. Кузнецов<sup>1</sup>

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЕЙВЛЕТ-АНАЛИЗА ДЛЯ ФИЛЬТРАЦИИ ИЗОБРАЖЕНИЙ В ЭЛЕКТРОННОЙ И ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

<sup>1</sup>ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,

<sup>2</sup>Саратовский государственный технический университет

Представлены результаты применения программ дискретного и стационарного вейвлет-анализа с целью фильтрации изображения объекта от шумов и повышения его разрешающей способности в электронной и зондовой микроскопии.

**Ключевые слова:** вейвлет-анализ, электронная и зондовая микроскопия.

Большую роль в расшифровке и визуализации фундаментальных механизмов организации и функционирования живой клетки призвана сыграть электронная и зондовая микроскопия.

При исследовании биологических объектов одним из основных условий является повышенное требование к получению максимально возможного разрешения на микрофотографиях. Однако специфика самих объектов способствует созданию нежелательных помех, вызванных наличием загрязнений раз-

личной природы (остатки питательной среды, конгломераты вещества – контрастера, красок, дефекты подложки, различного рода шумов аппаратуры и др.), присутствующих в исследуемом материале и ухудшающих воспроизведение исследуемых субмикроскопических структур.

Для устранения указанных помех используются различные математические методы обработки изображений, в частности, аппроксимация кривыми 1 и 2-го порядков, преобразования Фурье, а для уда-