



УДК 579.841.95–092.9+612.112.94+576.367

Особенности динамики апоптоза клеток крови экспериментальных животных, иммунизированных липополисахаридом туляремиального микроба разных подвидов

В. В. Войткова, В. И. Дубровина, С. А. Татарников, В. Б. Николаев,
Ж. А. Коновалова, А. С. Сорокумова

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Аннотация. Проведено сравнительное изучение действия липополисахарида (ЛПС) *Francisella tularensis* разных подвидов, выделенных твин-экстракцией и водно-фенольным методом, на интенсивность апоптоза клеток крови экспериментальных животных в условиях *in vivo*. С помощью современных методов клеточной биологии установлено, что ЛПС *F. tularensis*, независимо от подвиговой принадлежности, оказывает влияние на уровень циркулирующих апоптотических клеток. Сравнительный анализ показал, что способность клеток крови фиксировать на своей поверхности AnV в Ca^{2+} -зависимой среде в ответ на введение этих препаратов зависит как от подвиговой принадлежности, так и вирулентности *F. tularensis*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, липополисахарид, Т-лимфоциты, апоптоз, проточный цитофлуориметр.

Введение

История изучения возбудителя туляремии – *Francisella tularensis* – насчитывает более ста лет, тем не менее, до настоящего времени не собраны исчерпывающие сведения о факторах патогенности этой бактерии и механизмах её действия [6; 9; 10; 12]. В связи с этим особое внимание уделяется не только изучению патогенеза и иммуногенеза самого микроорганизма, но и детерминант вирулентности, которые могут быть использованы при конструировании химической вакцины. В частности, для создания вакцин важно знать, какие антигены являются протективными, а какие компоненты бактерий подавляют защитную функцию иммунной системы организма [2; 11].

Одним из возможных факторов патогенности туляремиального микроба рассматривается липополисахарид (ЛПС), поскольку с ним традиционно связывают реализацию многих жизненно важных функций бактерий [5]. *F. tularensis* является внутриклеточным паразитом и ведущим звеном в защите организма хозяина является клеточный фактор, т. е. макрофаги и лимфоциты. Известно, что *F. tularensis* вызывает имеющий значительную роль в механизмах сохранения клеточного баланса апоптоз инфицированных культур клеток мыши и че-

ловека [8]. Влияние ЛПС на апоптоз клеток крови не изучено, в связи с чем оценка уровня апоптоза по способности этих клеток фиксировать на своей поверхности фосфолипид-связывающий протеин AnnexinV (AnV) в Ca^{2+} -зависимой среде с помощью современных методов клеточной биологии [7] представляется актуальным методом исследования особенностей реагирования макроорганизма на ЛПС *F. tularensis*.

Цель настоящей работы – изучить интенсивность апоптоза клеток крови экспериментальных животных, иммунизированных ЛПС *F. tularensis* разных подвидов.

Материалы и методы

В работе использовали 144 сертифицированных (НПО «Вектор», Новосибирск) беспородных белых мыши с массой тела 15–20 г. Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.).

В качестве объекта исследования использовали препараты ЛПС, выделенные методом твин-экстракции (ЛПС_т) [4] и водно-фенольным методом (ЛПС_в) [1] из клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ (вакцинный штамм), *F. tularensis* subsp. *tularensis*

Schu 11 (Dcl, т. е. доза антигена, вызывающая гибель 100 % животных, для белых мышей составляет 1 КОЕ), *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250 (Dcl – 10 КОЕ), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* А-120 (Dcl – 10 КОЕ), *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 (авирулентен для белых мышей в дозе 1000 КОЕ). В качестве типичного ЛПС использовали коммерческий препарат ЛПС *Salmonella enteritidis* (Sigma). Контролем служили клетки интактных животных. При исследовании действия ЛПС препараты вводили животным подкожно в дозе 10 мг в 0,5 мл физиологического раствора. Учёт результатов проводили на 3-и, 6-е и 9-е сутки.

Материалом для исследования служила гепаринизированная кровь мышей. В 100 мкл крови добавляли лизирующий буфер FACS Lysing Buffer (BD Biosciences). Через 15 мин центрифугировали при скорости 1000 об/мин в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 1 мл десятикратного AnV-связывающего буфера (BD Biosciences) и отмывали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Отмывку повторяли дважды. Затем окрашивали моноклональными антителами. Фенотип лимфоцитов и их жизнеспособность определяли с использованием моноклональных антител (Becton Dickinson) в следующей панели: CD45-APC/CD3-FITC/CD4-Alexa-700/CD8-APC-Cy7/CD19-PE-Cy7/AnV-PE/7-AAD. Анализ окрашенных образцов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) в программе BD Diva 6.0. В каждой пробе анализировались 10 000 событий. После выделения лимфо- и моноцитарного гейта определяли количество ранних апоптотических клеток (AnV⁺7-AAD⁻) в режиме DotPlot. Тем же способом оценивали процент В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺), Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), находящихся на стадии раннего апоптоза.

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартного пакета прикладных программ «Statistica», версия 6 (StatSoft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897) с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена (r_s). Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение ($M \pm s$) из $n = 4$.

Результаты и обсуждение

Имеющиеся в литературе сведения о влиянии ЛПС туляремийного микроба на гибель

клеток крови экспериментальных животных скудны. Известно, что в реализации апоптоза клеток макроорганизма задействованы различные механизмы. Ранее нами выявлена тенденция ЛПС *F. tularensis* к активации бактерицидных систем фагоцитов и ключевого фермента апоптоза (каспаза-3) в условиях *in vitro*, тем не менее, различия между подвидами не были достоверными [3].

В результате проведенного эксперимента установлено, что доля апоптотических моноцитов и лимфоцитов в периферической крови экспериментальных животных, иммунизированных препаратами ЛПС *S. enteritidis* и *F. tularensis*, во все сроки наблюдения выше, чем в контроле (табл. 1). Так, показано, что способность клеток крови фиксировать на своей поверхности AnV в Ca²⁺-зависимой среде достоверно повышалась к 3-м суткам наблюдения ($P = 0,025$, по сравнению с контролем). Тем не менее, доля апоптотических Т-хелперов (табл. 2) при иммунизации мышей ЛПС *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* (независимо от способа получения – ЛПС/в), а также цитотоксических Т-лимфоцитов в случае иммунизации мышей ЛПС *F. tularensis* subsp. *holarctica* (10,3 %), была достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями экспериментальных животных, иммунизированных препаратами ЛПС туляремийного микроба других подвигов ($P = 0,049$). Наименее выраженная стимуляция апоптоза цитотоксических Т-лимфоцитов отмечена в случае инокуляции мышам ЛПС *F. tularensis* subsp. *tularensis* ($P = 0,049$). При сравнительном анализе показателей апоптотических CD3⁺CD4⁺ клеток всех групп экспериментальных животных, иммунизированных препаратами ЛПС *F. tularensis* разных подвигов, на 6-е сутки наблюдения достоверных различий не установлено. Для цитотоксических Т-лимфоцитов на 6-е сутки интенсивный апоптоз отмечен у животных, иммунизированных ЛПС/в *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15, ЛПС *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250 и ЛПС/в *F. tularensis* subsp. *tularensis* ($P = 0,037$). Показатели содержания AnV⁺В-лимфоцитов на 3-и сутки у экспериментальных животных, иммунизированных ЛПС *F. tularensis* subsp. *tularensis*, и на 6-е сутки – ЛПС/в *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* и ЛПС *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250 были достоверно низкими по сравнению с другими ЛПС *F. tularensis* ($P = 0,049$).

Таблица 1

Показатели апоптоза клеток крови мыши, иммунизированных липополисахаридом *S. enteritidis* и *F. tularensis* разных подвидов (M±s)

Объект исследования	Лимфоциты, %			Моноциты, %		
	Сроки наблюдения, сутки					
	3	6	9	3	6	9
Контроль	0,07±0,01			0,12±0,02		
<i>S. enteritidis</i>	0,7±0,1*	15,3±2,2*	1,0±0,3	0,8±0,2*	5,0±0,9*	1,2±0,1*
ЛПС <i>F. tularensis</i> , выделенный твин-экстракцией						
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 15	4,9±0,5*	11,2±1,8*	4,6±0,6*	6,1±1,5*	3,8±0,4*	5,4±0,9*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> И-250	8,2±1,8*	16,7±1,9*	2,3±0,7*	6,9±1,3*	3,8±1,1*	3,1±0,7*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i>	6,2±1,8*	11,9±2,4*	1,8±0,3*	7,3±1,7*	2,9±0,8*	2,7±0,7*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	2,7±0,8*	17,9±1,4*	5,3±1,2*	3,9±0,6*	5,3±0,9*	4,5±0,4*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	3,5±0,8*	15,1±2,1*	2,6±0,7*	2,7±0,5*	2,4±0,5*	4,3±0,9*
ЛПС <i>F. tularensis</i> , выделенный водно-фенольным методом						
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 15	3,9±0,6*	14,7±1,2*	3,9±0,9*	4,3±1,2*	4,1±1,0*	4,2±1,0*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> И-250	5,4±1,4*	17,1±2,2*	5,8±1,1*	7,0±1,1*	5,1±0,8*	5,7±1,6*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i>	6,5±1,5*	16,2±1,1*	8,8±1,7*	6,0±1,7*	3,1±0,2*	8,7±2,5*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	2,2±0,5*	18,7±1,7*	4,7±1,0*	4,2±0,7*	6,1±0,9*	5,6±0,7*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	2,8±0,5*	15,5±2,4*	3,8±0,9*	3,2±0,6*	3,8±0,7*	4,9±1,2*

Сравнительный анализ влияния ЛПС, выделенных из бактерий двух штаммов подвида *holarctica*, показал, что ЛПС *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250 стимулирует апоптоз субпопуляций лимфоцитов на 3-и сутки в большей степени, чем ЛПС *F. tularensis* 15, а на 6-е сутки статистически значимое различие было отмечено только для В-лимфоцитов, при этом уровень апоптоза этих клеток был выше у мышей, иммунизированных ЛПС вакцинного штамма (P = 0,047). Установлено, что ЛПС *F. tularensis* 15, полученный водно-фенольным методом, на 6-е сутки оказывает влияние на содержание AnV⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов в большей степени, чем ЛПС *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250 (P = 0,040).

У мышей, иммунизированных препаратами ЛПС *F. tularensis*, независимо от подвидовой принадлежности и способа их выделения на 9-е сутки наблюдения имели место высокие значения числа апоптотических клеток по сравнению с контролем (P = 0,025). Тем не менее, в случае ЛПС *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *mediasiatica* (см. табл. 1) отмечалось значи-

тельное снижение содержания AnV⁺ моноцитов и субпопуляций лимфоцитов не только по сравнению с 3-ми и 6-ми сутками (P = 0,040), но и с показателями для животных, иммунизированных препаратами ЛПС туляремийного микроба других подвигов (P = 0,049). Тем не менее, эти значения были достаточно высоки относительно контроля (P = 0,025). Установлено, что на 9-е сутки наблюдения у мышей, иммунизированных препаратами ЛПС туляремийного микроба разных подвигов, апоптоз CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов по сравнению с В-лимфоцитами был интенсивней в 1,4–4,2 раза (P = 0,040). Следует отметить, что в случае иммунизации мышей ЛПС *S. enteritidis* к 9-м суткам отмечалось снижение содержания лимфоцитов и их субпопуляций, связанных с AnV, до контрольных значений (см. табл. 1, 2). Наибольшие показатели процентного содержания моноцитов и субпопуляций лимфоцитов на стадии апоптоза выявлены у мышей, иммунизированных ЛПС *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* (P = 0,049). Кроме того, на 9-е сутки наблюдения установлена способность

ЛПСв *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* влиять на интенсивность апоптоза в большей степени, чем аналогичного ЛПС, выделенного твин-экстракцией ($P = 0,049$). На 6-е и 9-е сутки у мышей, иммунизированных ЛПСв *F. tularensis* subsp. *holarctica*, выявлен интенсивный апоптоз В-лимфоцитов. Высокие показатели апоптотических цитотоксических Т-лимфоцитов отмечены на 6-е сутки в случае ЛПС *F. tularensis* subsp. *holarctica* и ЛПСв *F. tularensis* subsp. *tularensis* ($P = 0,049$).

Сравнительный анализ полученных значений показал, что показатели содержания циркулирующих AnV^+ -моноцитов во все сроки наблюдения между группами экспериментальных животных, иммунизированных препаратами ЛПС *F. tularensis*, не имели статистически приходится на 6-е сутки ($P = 0,040$).

значимых различий. Следует отметить, что при иммунизации мышей ЛПС *S. enteritidis* и *F. tularensis* (независимо от подвиговой принадлежности) на 6-е сутки показатели апоптоза лимфоцитов превышали эти показатели моноцитов в среднем в 3,8 раза ($P = 0,049$), в то время как на 3-и (кроме *F. tularensis* subsp. *novicida*) и 9-е сутки достоверных различий не выявлено (см. табл. 1). Обращает внимание, что в случае ЛПС/в *F. tularensis* subsp. *tularensis* и ЛПСв *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* у экспериментальных животных на 9-е сутки отмечается повышение апоптоза моноцитов по сравнению с 3-ми и 6-ми сутками в 1,3–2,8 раз ($P = 0,040$). Установлено, что в случае воздействия на мышей ЛПС *S. enteritidis* пика числа циркулирующих AnV^+ моноцитов.

Таблица 2

Показатели апоптоза субпопуляций лимфоцитов мыши, иммунизированных липополисахаридом *S. enteritidis* и *F. tularensis* разных подвидов ($M \pm s$)

Объект исследования	В-лимфоциты, %			Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$), %			Цитотоксические Т-лимфоциты ($CD3^+CD8^+$), %		
	Сроки наблюдения, сутки								
	3	6	9	3	6	9	3	6	9
Контроль	0,12±0,03			0,34±0,07			0,15±0,04		
ЛПС <i>S. enteritidis</i>	0,8±0,2*	16,0±0,6*	0,4±0,1	1,7±0,1*	15,9±1,7*	1,2±0,1	0,6±0,1*	12,9±2,1*	1,4±0,2*
ЛПС <i>F. tularensis</i> , выделенный твин-экстракцией									
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 15	4,6±1,2*	15,3±1,5*	4,1±0,7*	7,8±1,3*	14,9±1,1*	9,4±1,9*	6,2±1,9*	12,9±2,2*	7,2±1,4*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> И-250	7,1±1,4*	9,5±2,1*	1,9±0,3*	11,4±0,5*	17,7±2,7*	6,1±1,2*	10,3±0,9*	14,7±3,4*	3,3±0,6*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i>	6,1±1,1*	8,3±2,3*	1,4±0,3*	9,6±1,6*	10,9±1,3*	5,9±0,8*	7,8±1,9*	6,2±1,1*	3,7±0,8*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	3,4±0,8*	15,8±3,7*	2,3±0,5*	5,6±1,0*	16,9±0,9*	7,1±1,1*	6,3±1,2*	7,7±1,8*	5,8±0,9*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	2,9±0,5*	12,5±2,1*	2,1±0,4*	4,9±0,9*	14,4±1,5*	7,5±1,9*	3,5±0,6*	9,4±1,1*	5,1±0,9*
ЛПС <i>F. tularensis</i> , выделенный водно-фенольным методом									
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 15	5,0±1,3*	15,7±2,1*	3,5±0,8*	6,8±1,9*	14,8±1,9*	8,2±2,9*	4,7±1,2*	12,7±2,9*	4,9±1,0*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> И-250	4,9±1,2*	16,9±1,9*	3,5±1,1*	9,2±1,9*	16,9±0,7*	6,9±1,9*	7,7±0,7*	4,9±0,6*	7,6±1,8*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i>	7,6±1,8*	10,9±1,0*	6,6±1,4*	10,1±2,6*	10,6±1,9*	13,6±2,7*	7,9±1,2*	5,4±0,9*	10,8±3,4*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	4,8±0,9*	16,5±4,2*	3,2±0,6*	5,9±1,0*	17,7±1,9*	8,4±2,0*	7,6±0,9*	8,3±0,8*	5,9±1,4*
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	3,4±0,6*	14,7±1,8*	2,6±0,5*	5,8±1,6*	16,4±1,1*	8,5±2,6*	4,1±1,0*	11,5±1,3*	6,2±0,9*

При анализе динамики апоптоза лимфоцитов (В-лимфоциты и Т-хелперы) установлено, что у всех групп экспериментальных животных пик апоптотической гибели клеток отмечается на 6-е сутки ($P = 0,040$). Исключение составили мыши, иммунизированные ЛПСв *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, для которых достоверных различий в динамике численности этих клеток не было выявлено. Тем не менее, отмечена тенденция к стимуляции апоптоза Т-лимфоцитов относительно ЛПСв *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* на 9-е сутки (в 1,3–2,0 раза больше, чем на 3-и и 6-е). Сравнительный анализ влияния ЛПС *S. enteritidis* и *F. tularensis* на апоптоз моноцитов и лимфоцитов периферической крови мышей показал, что способность этих клеток фиксировать AnV относительно ЛПС *F. tularensis* на 3-и сутки, а также на 9-е сутки (кроме ЛПС *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*), была выше в 2,2–11,7 раза, чем у мышей, иммунизированных ЛПС *S. enteritidis* ($P = 0,049$). Кроме того, на 3-и и 9-е сутки в эксперименте с ЛПС *F. tularensis* апоптоз Т- и В-лимфоцитов у экспериментальных животных выражен в большей степени по сравнению с мышами, иммунизированными ЛПС *S. enteritidis* ($P = 0,049$).

В целом у мышей, иммунизированных препаратами ЛПС *F. tularensis*, отмечена прямая корреляционная связь показателей вирулентности туляремиального микроба (Dcl) с количеством циркулирующих апоптотических клеток крови (табл. 3). Показано, что содержание В-лимфоцитов, связанных с AnV, не зависит от величины Dcl.

Таблица 3

Корреляционная связь вирулентности *F. tularensis* с апоптозом иммунизированных его липополисахаридом клеток крови мыши

Показатель	AnV ⁺ PI ⁻	
	r_s	P
Моноциты	0,45	0,026
CD3 ⁺	0,57	0,004
CD3 ⁺ CD4 ⁺	0,60	0,002
CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,47	0,021

Заключение

Таким образом, сравнительное изучение действия ЛПС *F. tularensis* разных подвидов, выделенных с помощью твин-экстракции и водно-фенольным методом, на интенсивность апоптоза клеток крови экспериментальных животных в условиях *in vivo* показало, что ЛПС туляремиального микроба независимо от подвиговой принадлежности оказывает влияние на

уровень циркулирующих апоптотических клеток. При этом препараты ЛПС, выделенные водно-фенольным методом, в большинстве случаев способствуют повышению апоптотических клеток крови по сравнению с ЛПС, выделенным первым методом.

Препараты ЛПС *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* (в дозе 10 мкг/мл фагоцитов) обладают слабым антигенным стимулом для активации кислородзависимого метаболизма [3], что, на наш взгляд, может свидетельствовать об экранирующей способности ЛПС туляремиального микроба в отношении антигенпрезентирующих клеток. Имунная реакция макроорганизма в ответ на введение этих препаратов зависит от подвиговой принадлежности и сроков наблюдения. Так, у мышей, иммунизированных ЛПС *F. tularensis* subsp. *tularensis*, на 3-и сутки отмечены наименьшие значения содержания апоптотических клеток (моноциты, субпопуляции лимфоцитов) по сравнению с другими препаратами ЛПС. Максимальные значения процентного содержания клеток, несущих на поверхности AnV, установлены на 6-е сутки наблюдения, что возможно, связано с особенностями течения инфекционного процесса при туляремии. При иммунизации мышей ЛПСв *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* на 9-е сутки по сравнению с другими сроками наблюдения (3-е и 6-е сутки) выявлен наиболее интенсивный апоптоз клеток крови.

Известно, что гибель клеток, в частности, Т-лимфоцитов, по апоптозному пути характеризуется низким уровнем ферментов «окислительного взрыва». Полученные в ходе экспериментов данные подтверждают результаты наших исследований влияния ЛПС туляремиального микроба на функциональную способность клеток иммунофагоцитарной системы и, возможно, указывают на участие ЛПС в механизмах уклонения от действия неспецифических факторов резистентности макроорганизма [3].

Результаты сравнительного анализа влияния препаратов ЛПС *F. tularensis* разных подвидов на активацию апоптоза клеток экспериментальных животных с помощью современных методов клеточной биологии способствуют пониманию механизмов иммуно- и патогенеза туляремии и открывают перспективы для дальнейшего более подробного изучения отдельных компонентов липополисахарида возбудителя туляремии разных подвидов.

Литература

1. Адамс Г. А. Выделение липополисахаридов из грамотрицательных бактерий / Г. А. Адамс // Методы исследования углеводов : пер. с англ. – М. : Мир, 1975. – С. 126–130.
2. Домарадский И. В. Проблемы патогенности франциселл и пути их решения / И. В. Домарадский // Журн. микробиол. – 2005. – № 1. – С. 106–110.
3. Особенности влияния липополисахарида туляремийного микроба разных подвидов на метаболическую активность фагоцитов в условиях *in vitro* / В. И. Дубровина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 2011. – Вып. 108, № 2. – С. 57–60.
4. Получение липополисахаридного антигена туляремийного микроба : метод. рекомендации / В. Б. Николаев [и др.] / Иркут. науч.-исслед. противочум. ин-т Сибири и ДВ. – Иркутск, 2010. – 5 с.
5. Павлович Н. В. Быстрый метод оценки вирулентности *Francisella tularensis in vitro* / Н. В. Павлович, М. В. Цимбалистова, Н. Н. Маслова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1997. – № 2. – С. 17–20.
6. Biosafety and selectable markers / R. W. Titball [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 1105. – P. 405–417.
7. Gerke V. Annexins: from structure to function / V. Gerke, S. E. Moss // Physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82. – P. 331–371.
8. Grunov K. Apoptosis versus necrosis of host cells after infection with *F. tularensis* / K. Grunov, W. Spletstoesser // The 3-rd Int. Conf. on Tularemia. Umea, Sweden, August 27–30. – 2000. – P. 53.
9. Oyston P. C. Tularemia: bioterrorism defense renews interest in *Francisella tularensis* / P. C. Oyston, A. Sjostedt, R. W. Titball // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – Vol. 2. – P. 967–978.
10. Public health assessment of potential biological terrorism agents / L. D. Rotz [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 8. – P. 225–230.
11. Sjostedt A. B. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations / A. B. Sjostedt // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 1105. – P. 1–29.
12. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management / D. T. Dennis [et al.] // JAMA – 2001. – Vol. 285. – P. 2763–2773.

Dynamics of blood cells apoptosis of experimental animals immunized by tularemia lipopolysaccharide

V. V. Voitkova, V. I. Dubrovina, S. A. Tatarnikov, V. B. Nikolaev,
Sh. A. Konovalova, A. S. Sorokoumova

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor, Irkutsk

Annotation. Action of a lipopolysaccharide (LPS) *Francisella tularensis* various subspecies, extracted by classic water-phenolic method and the twin-extraction on intensity of blood cells apoptosis of experimental animals *in vivo* is studying. Using modern methods of cellular biology LPS of tularemia agent, independently of a subspecies belonging, exert ambiguous influence on a level circulating apoptotic cells. The comparative analysis has showed that immune reactivity of macroorganism after inoculation of these preparations depends on a subspecies belonging as well as on virulence of *F. tularensis*.

Key words: *Francisella tularensis*, lipopolysaccharide, T-lymphocyte, apoptosis, cellular biology, flow cytometry

Войткова Валентина Владимировна
Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
664047, Иркутск, Трилиссера, 78
младший научный сотрудник
тел. (3952)22–13–12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Voitkova Valentina Vladimirovna
Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rospotrebnadzor
78 Trilisser St., Irkutsk, 664047
junior research scientist
phone: (3952)22–13–12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Дубровина Валентина Ивановна
Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
664047, Иркутск, Трилиссера, 78
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией патофизиологии
тел. (3952)22–13–12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Dubrovina Valentina Ivanovna
Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rospotrebnadzor
78 Trilisser St., Irkutsk, 664047
D. Sc. in Biology, Head of laboratory
phone: (3952)22–13–12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

*Татарников Станислав Александрович
Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
664047, Иркутск, Трилиссера, 78
кандидат медицинских наук, научный сотрудник
тел. (3952)22-13-12*

*Tatarnikov Stanislav Aleksandrovich
Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rospotrebnadzor
78 Trilisser St., Irkutsk, 664047
Ph.D. in Medicine, research scientist
phone: (3952)22-13-12*

*Николаев Валерий Борисович
Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
664047, Иркутск, Трилиссера, 78
кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952)22-13-12*

*Nikolaev Valeriy Borisovich
Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rospotrebnadzor
78 Trilisser St., Irkutsk, 664047
Ph.D. in Medicine, senior research scientist
phone: (3952)22-13-12*

*Коновалова Жанна Анатольевна
Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
664047, Иркутск, Трилиссера, 78
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952)22-13-12*

*Konovalova Zhanna Anatolyevna
Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rospotrebnadzor
78 Trilisser St., Irkutsk, 664047
Ph.D. in Biology, senior research scientist
phone: (3952)22-13-12*

*Сорокоумова Алёна Сергеевна
Иркутский государственный
медицинский университет Росздрава
664003, г. Иркутск, ул. Красного восстания, 1
студент
тел. (3952)24-38-25*

*Sorokoumova Alena Sergeevna
Irkutsk State Medical University
1 Krasnogo Vosstaniya St, Irkutsk, 664003
student
phone: (3952)24-38-25*