

На правах рукописи

ОНИКИЕНКО

Сергей Борисович

**СТРАТЕГИЯ ПЕРЕКРЕСТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ
ВОЗДЕЙСТВИЯХ НА ОСНОВЕ ФИЗИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ
БИООБЪЕКТОВ И ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ
БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА-70
(клинико-экспериментальное исследование)**

14.03.03 – патологическая физиология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

**Санкт-Петербург
2019**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН **Черешнев Валерий Александрович**

Официальные оппоненты:

Лобзин Юрий Владимирович, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», директор.

Ушаков Игорь Борисович, заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, ФГБУ ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна», главный научный сотрудник.

Шилов Виктор Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, заведующий кафедрой токсикологии, экстремальной и водолазной медицины.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2020 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.022.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр. д. 69-71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул.Академика Павлова, д. 12 и на сайте [http: //iemsfb.ru/ science/ diss/diss001-022-02/](http://iemsfb.ru/science/diss/diss001-022-02/)

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета Д 001.022.02
кандидат биологических наук, доцент

Алешина Галина Матвеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Актуальной задачей современной патофизиологии является изучение патогенетических механизмов развития дезадаптации и разработка оптимальных стратегий защиты и адаптации организма при экстремальных воздействиях.

Клеточной основой развития системного воспаления при экстремальных воздействиях являются реакции клеточного стресса. Их генерализация на системном уровне — основа патогенеза экстремальных состояний [Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., 2012 ; Gusev E.Y., Zotova N.V., 2019]. Истощение механизмов адаптации ведет к развитию анергии с высоким риском летального исхода.

Стратегия поиска возможностей повышения выживаемости людей, пострадавших в результате экстремальных воздействий основана на необходимости устранения патологических синдромов дезадаптации: клеточного стресса и его системных проявлений (системного воспаления). Известно, что белок клеточного стресса БТШ70 повышает выживаемость и адаптацию клеток в экстремальных условиях [Pockley A.G., Henderson B., 2018; Roufavel R., Kadry S., 2019]. Он перекрестно повышает толерантность к разным экстремальным воздействиям [Андреева Л.И., 2002; Андреева Л.И. и соавт., 2009].

БТШ70 активирует механизмы перекрестной защиты организма при летальных инфекциях [Остров В. Ф. и соавт., 2011; Махлай А.А. и соавт., 2011; Li G. et al., 2011], поражениях при токсических [Matsumoto M. et al., 2008; Gupta S.C. et al., 2010, Clark D.S. et al., 2011], радиационных воздействиях [Вербенко В.Н. и соавт., 1986; Gordon et. al., 1997] и экстремальных физических нагрузках [Morton J.P. et al., 2009; Шкурников М. Ю., 2009; Гребенюк Е.С. и соавт., 2010].

В фазе гипореактивности и анергии выявлена избыточная экспрессия «тормозных» рецепторов клеток-эффекторов иммунной системы. Блокаторы «тормозных» PD-1 и Tim-3 рецепторов Т-лимфоцитов предотвращают развитие иммуносупрессии и повышают эффективность лечения критических состояний: сепсиса [Yao Y. et al., 2017; Zhang Q. et al., 2018], респираторного дистресс-синдрома, геморрагического шока [Lomas-Neira J. et al., 2018], высокопатогенного гриппа [Rutigliano J.A. et al., 2014] и травматических поражений [Rouget C. et al., 2017].

Нобелевская премия по медицине в 2018 году была присуждена за открытие «тормозных» рецепторов лимфоцитов и создание их блокаторов.

Установлено, что БТШ70 является двойным блокатором «тормозных» PD-1 и Tim-3 рецепторов лимфоцитов [Оникиенко С.Б. и соавт., 2016].

Активность этих рецепторов снижается из-за нарушения их взаимодействия с эндогенными активаторами. Это может быть обусловлено связыванием БТШ70 с лигандами Tim-3 рецепторов HMGB1 (амфотерином) [Hasegawa A. et al., 2011; Dolina J.S. et al., 2014] и фосфатидилсерином [Lopez V. E et al., 2016; Gandhi A.K. et al. 2018 ; Bilog A.D. et al., 2019]. Дефицит образования и мобилизации эндогенных БТШ70 в ответ на различные раздражители приводит к избыточной активации «тормозных» рецепторов лимфоцитов и развитию иммуносупрессии. Это обосновывает целесообразность применения экзогенных БТШ70 для предотвращения гипореактивности и анергии («иммунный паралич») из-за гиперэкспрессии «тормозных» PD-1 и Tim-3 рецепторов при экстремальных стрессорных воздействиях.

Источниками защитных БТШ70 могут быть микроорганизмы, например *E. Coli* и пищевые дрожжи [Wendling U., Farine J.C., 1998; Баснакьян И.А. и соавт., 2010; Clark D.S. et al., 2011]. Химическими индукторами БТШ70 являются бактериальные ЛПС [Yao Y.W. et al., 2011], производные хиноидных соединений [Маргулис Б. А. и соавт., 2010; Liu B. et al., 2012] и адаптогены [Panossian A. et al., 2009; Андреева Л.И. и соавт., 2013].

Для защиты от биопатогенов, химических и радиационных поражений используют лиганды TLR4 и TLR5 рецепторов – нетоксичные производные бактериального эндотоксина и флагеллин [Софронов Г.А. и соавт., 2017; Vijay-Kumar M. et al, 2008; Perrin-Cocon L. et al., 2017; Aparin P.L et al., 2018], а также лиганды Fc-рецепторов [Fudala R. et al., 2010 ; Jegaskandra S. et al., 2018]. БТШ70 может связываться с бактериальным эндотоксином и запускать механизмы его нейтрализации [Asami K. et al. 2017].

Разработка препаратов на основе рекомбинантных БТШ70 и нетоксичных производных бактериальных ЛПС для коррекции иммунных нарушений при воздействии биопатогенов и факторов абиотического стресса является актуальной проблемой патофизиологии экстремальных состояний.

БТШ70 относят к сигнальным молекулам повреждения, которые запускают защитные механизмы клеток при экстремальных воздействиях [Ren B. et al., 2016]. Эти молекулы можно получить путем моделирования повреждения биомембран при воздействии на них физических факторов высокой интенсивности, например, лазерного излучения и пучка электронов.

«Перекрестная защита» - это развитие устойчивости к различным экстремальным воздействиям высокой интенсивности путем активации реакций адаптации организма в ответ на раздражители умеренной интенсивности [Меерсон Ф.З., 1993]. Стратегия перекрестной защиты направлена на выживание организма при экстремальных патогенных воздействиях.

Объективные трудности экспресс-диагностики экстремальных патогенных воздействий (ионизирующее излучение, токсические химикаты, биопатогены) и неопределенность потенциальных угроз ограничивают эффективность средств узконаправленного действия и диктуют необходимость разработки средств перекрестной защиты широкого спектра действия.

Решение проблемы перекрестной защиты от невакцинных штаммов биопатогенов также является актуальной задачей патологической физиологии и медицины экстремальных состояний [Vojtes I. et al., 2019]

Представляется актуальным спектр вопросов, связанных с развитием иммунных нарушений и изменением течения заболеваний при длительном воздействии на организм факторов абиотического стресса малой интенсивности [Никифоров А.М., 1994; Комаревцев В.Н., 2000; Щербак С.Г., 2002].

Особое внимание привлекает проблема коррекции иммунных и метаболических нарушений, обусловленных длительным воздействием на организм малых доз токсических химических веществ [Язенок А.В., Сосюкин А.Е., 2008 ; Петленко С.В. и соавт., 2011].

Химические загрязнители и бактериальные эндотоксины запускают универсальный синдром клеточного стресса, который сопровождается повышением образования защитных белков стресса – БТШ70 [Matsumura F., Vogel C. F. , 2006 ; Padmini E. , 2010 ; Xin L. et al. , 2015]. При длительном воздействии ксенобиотиков уровень защитных БТШ70, наоборот, снижается [Matsumoto M., et al., 2008].

Интенсивность и продолжительность действия раздражителя определяют время перехода из фазы гиперреактивности в фазу гипореактивности клеточного стресса и выбор резистентной или толерантной стратегии адаптации. Для резистентной стратегии характерно повышение продукции цитокинов, активация клеток, а для толерантной, наоборот, снижение этих показателей [Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., 2012; Гусев Е.Ю., Черешнев В. А. 2013]. Это является основанием для назначения активирующей или заместительной терапии, в частности экзогенных БТШ70.

Синдромно-сходные иммунные нарушения (феномен гипореактивности иммунной системы) развиваются при длительном воздействии на организм химических загрязнителей и затяжном течении язвенной болезни желудка [Пальцев А.И, 2005; Начарова Е.П., 2006; Диброва Ю.А, 2009; Лоторева Ю.А., 2010].

При длительных экотоксических нагрузках течение язвенной болезни желудка приобретает затяжной характер [Исхаков М.Н., 1996; Помыткина Т.Е., 2011]. БТШ70 способствуют заживлению язвенных поражений желудка [Ishihara T. et al., 2011].

Адаптогены и актопротекторы повышают работоспособность при экстремальных истощающих физических нагрузках, препятствуют развитию рабдомиолиза [Лесиовская Е.Е., 1993; Новиков В.С. и соавт., 1998]. Сходство структуры молекулы синтетических актопротекторов и индукторов БТШ70 на основе природных хиноидных соединений позволяет предположить, что актопротекторы могут быть индукторами БТШ70.

Известные адаптогены (жень-шень, элеутерококк, родиола розовая) являются одновременно актопротекторами и индукторами эндогенных БТШ70 [Panossian A., Wikman G., 2009; Asea A. et al., 2013].

Разработка новых технологий активации микроорганизмов-продуцентов БТШ70, получения защитных белков стресса при воздействии на клетки физических факторов и химических индукторов БТШ70, изучение эффективности применения этих белков и продуктов их химической модификации для защиты от поражений при экстремальных воздействиях является актуальной проблемой патологической физиологии экстремальных состояний.

Таким образом, разработка новых стратегий перекрестной защиты при экстремальных воздействиях, коррекции иммунных и метаболических нарушений, вызываемых длительном воздействием малых доз токсических веществ, является актуальной задачей патологической физиологии и медицины экстремальных состояний.

Степень разработанности темы исследования

В работах В.А. Чершнева и Е.Ю. Гусева (2004-2019) представлено патофизиологическое обоснование необходимости ликвидации синдрома клеточного стресса (клеточной основы «системного воспаления») для перекрестной защиты от экстремальных воздействий. Проблемам раскрытия механизмов перекрестной адаптации и разработки средств перекрестной защиты при экстремальных патогенных воздействиях посвящены труды отечественных ученых: Н.В.Лазарева (1959), Л.А.Тиунова (1995), И.И. Брехмана (1990), Ф.З.Меерсон (1993), Е.Б.Шустова (1996), В.С.Новикова (1998), Л.Х. Гарькави (2006), Л.А. Степановой (2013).

Существенный вклад в изучение роли TLR и Fc-рецепторов в механизмах защиты от биопатогенов, радиационных и токсических воздействий внесли В.В. Зверев (2007), С.А. Недоспасов (2012), М. Vijay-Kumar (2008), К. El-Bakkouri (2011), К. Baker (2013).

В работах S. M. Oral (2005), И.М. Ермак (2006), М.Г. Винокурова (2009), А.А. Маркиной (2017), N.Lee (2010), S. Korff (2013), К.А. Shirey (2013), D.R. Weilhammer (2013) показана перспективность применения нетоксичных производных микробных ЛПС при экстремальных патогенных воздействиях.

Большой вклад в разработку средств защиты от биопатогенов и токсических веществ на основе БТШ70 внесли Г.А. Кустанова (2006), Б.А. Маргулис (2009, 2010), А.А. Махлай (2011), М.Б. Евгеньев (2013), S.K. Calderwood (2007), G. Multhoff (2006), A. Asea (2008, 2013), R. Morimoto (2011), K. Asami (2017).

Исследования М.Ю. Шкурникова (2009, 2012), Е.С. Гребенюк (2010), J.P. Morton (2009), S. Oliynyk (2012, 2013), S.M. Gehrig (2012), S.M. Senf (2013), C.S Moura (2017) позволили выявить у БТШ70 свойства актопротекторов и миопротекторов.

В последнее десятилетие прорыв в области биологических инновационных технологий определил появление рекомбинантных белков пролонгированного действия (конъюгаты белков с ПЭГ, Fc-гибридные белки), что позволило значительно повысить эффективность их применения в клинической медицине [Jafari R., 2017; Solelmampour S., 2017]

В работах И.П. Ивановой (2009), В.Г. Спинова (2009), М.И. Заславской (2009), В.А. Шестакова (2013), О. N. Pachomova (2012), К. Morotomi-Yano (2012), S.J. Beebe (2013),

определены новые подходы к получению средств защиты от патогенных воздействий на основе стресс-активации и модификации биообъектов при импульсном воздействии на них физических факторов высокой интенсивности.

Однако в трудах этих ученых не определены оптимальные параметры физических воздействий, необходимые для стресс-активации биообъектов, получения нетоксичных производных ЛПС и средств защиты от экстремальных патогенных воздействий.

Не разработаны стратегии применения модифицированных ЛПС и БТШ70 для защиты от биопатогенов, радиационных и токсических воздействий.

Не решены задачи подбора оптимальных доз препаратов, сроков их назначения, продолжительности лечения, эффективности сочетанного применения нетоксичных производных ЛПС и БТШ70, целесообразности назначения экзогенных БТШ70 или мобилизации их из клеточных депо.

Отсутствуют технологии получения рекомбинантных БТШ70 пролонгированного действия. Недостаточно раскрыты клеточные механизмы перекрестной иммунной защиты и при экстремальных воздействиях .

Цель исследования

Обосновать стратегию и разработать методы активации «перекрестной защиты», повышения устойчивости к экстремальным воздействиям – биопатогенам, массивной кровопотере, длительному сдавливанию мягких тканей, токсическим химикатам, ионизирующей радиации, интенсивным истощающим физическим нагрузкам и глубоководным погружениям на основе продуктов физической модификации биообъектов и химической модификации БТШ70.

Задачи исследования

1. Представить патофизиологическое обоснование стратегии перекрестной защиты от биопатогенов, токсических и радиационных поражений
2. Установить БТШ-зависимые механизмы защиты от респираторного дистресс-синдрома при высокопатогенном гриппе и отравлении фосгеном у мышей
3. Разработать адъюванты вакцин на основе лазерной мобилизации эндогенных БТШ70, применения экзогенных БТШ70 и физической модификации биообъектов
4. На основе применения БТШ70 разработать технологии повышения устойчивости к массивной кровопотере, длительному сдавливанию мягких тканей, интенсивным истощающим физическим нагрузкам и глубоководным погружениям
5. Оценить эффективность применения БТШ70 и их индукторов для восстановления функций иммунной системы при экотоксических нагрузках в эксперименте и у работников нефтеперерабатывающего предприятия
6. Предложить активационные пробы для выбора тактики лечения БТШ-зависимых патологических процессов при экстремальных воздействиях

Научная новизна

Разработаны новые технологии модификации биообъектов с использованием пучка электронов и лазерного излучения, показан их защитный эффект на экспериментальных моделях патологических состояний, обусловленных биопатогенами, токсическими и радиационными воздействиями.

На основе БТШ70 разработаны средства защиты от токсического отека легких, высокопатогенного гриппа у мышей, геморрагического шока, травматического токсикоза и радиационных поражений, профилактики и лечения декомпрессионной болезни при экстремальных глубоководных погружениях.

Впервые установлен молекулярный механизм защитного действия БТШ70 при токсическом отеке легких и высокопатогенном гриппе у мышей – ликвидация выраженного дисбаланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IL-6/IL-10), нейтрализация воспалительного цитокина замедленного действия HMGB1, восстановление реактивности иммунной системы путем блокады «тормозных» PD-1 и Tim-3 рецепторов Т-лимфоцитов.

Впервые получены инновационные препараты пролонгированного действия на основе конъюгатов БТШ70 с полиэтиленгликолем и гибридные белки на основе БТШ70 и Fc-фрагмента IgG человека (патенты США № 9217018, № 9937281).

Впервые получены нетоксичные низкомолекулярные производные бактериальных эндотоксинов путем электронно-лучевой обработки исходного сырья с последующим фракционированием методом ультрафильтрации (патент РФ № 2662916).

Разработана новая технология получения адъювантов вакцин, основанная на применении лазеров для индукции выхода БТШ70 из клеток кожи во внеклеточное пространство с последующим введением вакцины в зону облучения (Патент РФ № 2345788, Европатент EP-2341932, патент США № 10052376).

Впервые выявлены актопротекторные свойства экзогенных БТШ70 и продуктов их химической модификации (патент США № 9616100, патент РФ № 2654231)

Разработана инновационная технология модификации пучком электронов вируса гриппа и парамиксовируса Сендай для получения средств перекрестной защиты от разных штаммов вируса гриппа.

Впервые установлены защитные свойства БТШ70 и их индукторов, продуктов радиационной модификации полисахаридов Зостеры и бактериальных ЛПС при экотоксических воздействиях в эксперименте.

Для выбора тактики коррекции иммунных и метаболических нарушений при экотоксических воздействиях предложены активационные пробы (инкубация лейкоцитов крови с ЛПС) и гипоксическая ингаляционная проба (индукция секреции БТШ70).

Впервые установлена связь защитного эффекта масляного экстракта хмеля с восстановлением функций рецепторов врожденного иммунитета при экотоксических воздействиях, разработана оригинальная технология его получения (патент РФ №2344167).

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Разработана научная концепция перекрестной защиты от экстремальных патогенных воздействий путем блокады механизмов развития клеточного стресса и его системных проявлений с использованием нетоксичных производных бактериальных ЛПС и БТШ70. Они повышают устойчивость к токсическим и радиационным воздействиям, биопатогенам, массивной кровопотере, защищают организм от травматического токсикоза, экстремальных физических нагрузок и развития декомпрессионной болезни при барокамерном моделировании глубоководных погружений

Предложена концепция стресс-ксенобиотерапии – применение продуктов стресс-активации ксеногенных организмов по отношению к защищаемому для протезирования защитных механизмов клеток при истощении резервов адаптации.

Доказана взаимосвязь развития гипореактивности иммунной системы при различных экстремальных воздействиях с гиперэкспрессией «тормозных» PD-1 и Tim-3 рецепторов Т-лимфоцитов и обоснована возможность использования блокаторов этих рецепторов для восстановления реактивности иммунной системы. На моделях токсического отека легких и высокопатогенного гриппа у мышей доказано, что БТШ70 и гибридные белки на основе БТШ70 и Fc-фрагмента IgG (БТШ70-Fc) блокируют «тормозные» PD-1 и Tim-3 рецепторы,

экспрессия которых повышается при остром респираторном дистресс-синдроме.

Раскрыты молекулярные и клеточные механизмы защитного эффекта БТШ70 и продуктов его химической модификации при экстремальных истощающих физических нагрузках: увеличение плотности капиллярной сети, восстановление целостности мембран миоцитов и мобилизация сателлитных клеток мышц.

Установлен механизм повышения эффективности вакцинации при лазерном облучении кожи в зонах введения противогриппозной вакцины – мобилизация эндогенных БТШ70, которые обладают свойствами адъювантов вакцин..

Доказаны теоретические положения о целесообразности назначения заместительной терапии на основе экзогенных БТШ70 в фазу гипореактивности и анергии клеточного стресса при длительном воздействии на организм химических загрязнителей.

Значение результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Разработаны лазерные адъюванты вакцин, которые повышают их иммуногенность и могут существенно (в 50-100 раз) снизить дозу вакцины, необходимую для осуществления эффективной вакцинации.

Создание средств перекрестной защиты от родственных штаммов микроорганизмов на основе модификации вирусов пучком электронов позволит сэкономить средства на получение новых вакцин, связанных с мутациями этих микроорганизмов.

Разработано новое поколение блокаторов «тормозных» PD-1 и Tim-3 рецепторов Т-лимфоцитов – рекомбинантные БТШ70 и гибридные белки на основе БТШ70 и Fc-фрагмента IgG человека (БТШ70-Fc), которые могут быть использованы для восстановления реактивности иммунной системы при БТШ-зависимых патологических процессах с повышенной экспрессией этих рецепторов.

Доказано, что экзогенный БТШ70 и его производные пролонгированного действия повышают работоспособность и препятствуют развитию поражений мышц при интенсивных истощающих физических нагрузках.

Они являются перспективными средствами перекрестной защиты от пульмонотоксикантов, травматического токсикоза, радиационных поражений, повышения устойчивости организма к массивной кровопотере, предотвращения развития геморрагического шока, декомпрессионной болезни при глубоководных погружениях, а также защиты от экотоксических воздействий.

Определена эффективность применения индукторов БТШ70, а также продуктов физической модификации бактериальных ЛПС и растительных полисахаридов для защиты от экотоксических воздействий.

Активационные пробы с бактериальным ЛПС можно использовать для выбора адекватных путей коррекции иммунных нарушений при экотоксических воздействиях в разные фазы интоксикации: в первой фазе – нетоксичных производных ЛПС для подавления избыточной активации TLR4, а во второй – экзогенного БТШ70 и его индукторов для восстановления реактивности иммунной системы организма.

Отрицательные результаты активационных проб являются основой для назначения заместительного лечения – стресс-ксенобиотерапии (продуктов стресс-активации ксеногенных организмов по отношению к защищаемому).

Методология и методы исследования

Методология исследования подразумевает сравнительную оценку эффективности средств защиты при экстремальных воздействиях (токсичные химикаты, ионизирующее излучение, биопатогены, массивная кровопотеря, истощающие физические нагрузки, травматический токсикоз в эксперименте и клинических условиях. Исследование выполнено с соблюдением всех принципов экспериментальной и клинической эпидемиологии (отбор,

рандомизация, формирование референтных групп, контроля, статистическая обработка результатов). Дизайн клинического раздела работы представляет собой обсервационное когортное проспективное и ретроспективное сравнительное исследование с привлечением клинических, лабораторных, инструментальных и статистических методов исследования. Экспериментальный раздел работы выполнен в дизайне рандомизированного открытого исследования с использованием иммунологических, токсикологических, радиобиологических, лабораторных и статистических методов исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Стратегия перекрестной защиты при экстремальных воздействиях (токсичные химикаты, ионизирующее излучение, биопатогены) включает применение продуктов модификации пучком электронов вирусов и бактериальных ЛПС, лазерной активации дрожжевых культур и экзогенных БТШ70.
2. Применение БТШ70 и их производных пролонгированного действия повышает устойчивость организма к массивной кровопотере, длительному сдавливанию мягких тканей, экстремальным глубоководным погружениям и интенсивным истощающим физическим нагрузкам
3. Лазерное облучение кожи в зоне вакцинации и модификация вирусов пучком электронов повышают эффективность применения противогриппозной вакцины
4. БТШ70 и их индукторы восстанавливают активность иммунной системы при экотоксических воздействиях в эксперименте и у сотрудников нефтеперерабатывающего предприятия.

Степень достоверности результатов работы

Степень достоверности определяется большой выборкой наблюдаемых контингентов с формированием изучаемой группы и группы сравнения, большим количеством экспериментальных животных, рандомизированных с формированием групп сравнения и активного контроля, адекватными методами исследования, длительными сроками наблюдения и корректными методами статистической обработки. Сформулированные в диссертации выводы, положения и рекомендации аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов выполненных исследований.

Апробация и практическая реализация

По теме диссертации опубликовано 79 печатных работ, сделано 57 докладов на научных конференциях. Материалы диссертации доложены на Всеармейских научно-практических конференциях: «Медицинские последствия экстремальных воздействий на организм» (С-Пб, 2000), «Терапевтическая помощь в экстремальных ситуациях» (С-Пб, 2003); конференциях «Актуальные вопросы диагностики и лечения» (С-Пб, 1995, 1997, 1999, 2001); международном форуме «Канун III тысячелетия – время итогов» (М., 1999); международных конференциях «Оптика лазеров» (С-Пб., 1993, 2000, 2010); конференции «Современные технологии диагностики и терапии инфекционных болезней» (С-Пб, 1999); международной научной конференции «Вирусные инфекции на пороге XXI века: эпидемиология и профилактика» (С-Пб, 1999); VI Российском съезде врачей-инфекционистов (С-Пб, 2003); Всероссийской научно-практической конференции «Гастроэнтерологические аспекты врачебной практики» (С-Пб, 2000, 2001); научно-практической конференции «Военно-морская и радиационная гигиена: достижения и итоги развития» (С-Пб., 2000); научно-практических конференциях «Достижения и проблемы военно-морской и клинической медицины» (С-Пб, 1995); «Актуальные вопросы госпитальной медицины» (Севастополь, 2003); VIII Международном конгрессе европейской медицинской лазерной ассоциации (М.,

2001); II, III, IV съездах токсикологов России (М., 2003, 2008, 2013); научно-практической конференции «Актуальные вопросы военной и практической медицины» (Оренбург, 2004); I Международной конференции по химии и коммерциализации химических технологий (М., 2004); VII и X Всероссийских научно-практических конференциях «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения больных в многопрофильном лечебном учреждении» (С-Пб., 2005, 2011); 36-ом и 39-ом Всемирных конгрессах по военной медицине (С-Пб, 2005; Абуджа, Нигерия, 2011); II Всемирном конгрессе по стрессу (Будапешт, 2007); конференции Европейской оптической ассоциации (Париж, 2008); IV, V, VI международных симпозиумах «Белки теплового шока в биологии и медицине» (Вудс-Холл, США, 2008, 2010; Александрия, США, 2012); Всероссийской научно-практической конференции «Химическая безопасность Российской Федерации в современных условиях (С-Пб, 2010); V, VI международных конгрессах «Белки стресса в биологии и медицине» (Квебек, Канада, 2011; Шеффилд, Великобритания, 2013), II международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные, прикладные исследования в физиологии и медицине» (С-Пб, 2011); V Всемирной научной конференции «Защита от биологических, химических, лучевых и ядерных поражений» (Норфолк, США, 2012), круглом столе «Фундаментальная наука Военно-Морскому флоту» в рамках международного военно-морского салона (С-Пб, 2013), Международном Форуме «Экстремальная медицина и биология. Инвестиционные проекты России» (С-Пб, 2013), Международной научно-практической конференции по военной медицине (С-Пб, 2013), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики, профилактики и лечения профессионально обусловленных заболеваний» (Сочи, 2013), III Международной научно-практической конференции «Современные проблемы безопасности жизнедеятельности: настоящее и будущее» (Казань, 2014); научно-практической конференции, посвященной проблемам изучения резистентности организма к действию экстремальных факторов внешней среды (С-Пб, 2014); Международной научной конференции «Атомтех-2015» (М., 2015), Всероссийских научных конференциях: «Медико-биологические проблемы токсикологии и радиологии» (С-Пб, 2015); «Фармакология экстремальных состояний» (С-Пб, 2015), «Совершенствование системы радиационной, химической и биологической защиты войск и населения страны в мирное и военное время» (М., 2015, 2017), «Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии» (Екатеринбург, 2016), «Ядерные технологии на страже здоровья» (М., 2016), «Медико-биологические аспекты обеспечения химической безопасности Российской Федерации» (С-Пб, 2017), «Токсикология и радиобиология XXI века» (С-Пб, 2017), «Актуальные проблемы медико-санитарного обеспечения деятельности объектов морской техники, предприятий с вредными и опасными производственными факторами, а также экологического благополучия территорий, обслуживаемых Федеральным медикобиологическим агентством (С-Пб, 2017), «Актуальные направления развития медицинских средств защиты от экстремальных факторов» (М., 2017), международной научной конференции «Ингибиторы иммунных контрольных точек» (Бостон, США, 2016, 2017, 2018), «Актуальные вопросы военно-полевой терапии» (С-Пб, 2019).

Результаты исследований защищены патентами РФ №2191604 «Способ получения биологически активных веществ», №2209085 «Способ повышения антигенности и иммуногенности биоматериала», №2272420 «Способ активации дрожжей», №2344167 «Хмелевой экстракт», №2345788 «Способ лазерной вакцинации больных с метастатическими формами рака»; №2654231 «Способ применения БТШ70 для повышения работоспособности и лечения БТШ70-зависимых заболеваний», №2685867 «Гибридные белки и белковые конъюгаты на основе белка теплового шока-70 (БТШ70) и способы их применения», №2662916 «Способ терапии метастатического рака с использованием вируса Сендай», Европатентом EP-2341932 «Получение адъювантов вакцин с помощью высокоинтенсивных электрических воздействий, патентами США №10052376 «Laser-based vaccine adjuvants», №9217018 «Hsp70 fusion protein

conjugates and uses thereof», №9937241 «Degradation resistant Hsp70 formulations and uses thereof», №9616100 «Methods of use Hsp70 for increased performance or treatment of Hsp70 related diseases».

Результаты исследования внедрены в работу кафедр и клиник ВМА (военно-полевой терапии, пропедевтики внутренних болезней, общей и военной эпидемиологии); НИИ гигиены, профессиональной патологии и экологии человека (пос. Кузьмолово, Ленинградская область); Государственной Корпорации «Ростех» (АО «РТ-Медицина»), Центра Вакцин и Иммунотерапии Главного Госпиталя штата Массачусеттс, США; компании «Boston-Bioscom», Бостон, США.

Исследование «Поисковые исследования по разработке методов наноструктурной модификации микроорганизмов и биоматериалов в интересах создания перспективных средств борьбы с опасными инфекциями, последствиями воздействия высокотоксичных химических соединений и скрытного воздействия на ВВТ» проведено в рамках Гособоронзаказа (госконтракт №542/01). Работа поддержана РФФИ по проектам: №010132 «Исследование физических и механических процессов в биологических материалах при интенсивных импульсных воздействиях»; №0401325 «Теоретическое и экспериментальное исследование гидродинамических процессов с импульсными воздействиями на биообъекты в жидкости»; №040108821 «Разработка методов импульсной гидродинамической модификации и активации биообъектов»; № И-0771 «Лазерные технологии модификации биоматериалов для создания вакцин нового типа и разработка перспективных подходов к диагностике и лечению ряда социально значимых заболеваний человека» ФЦП «Интеграция науки и высшего образования России на 2002-2006 гг.».

Центром «Биопромышленная Инициатива» Госдепартамента США поддержан наш проект «Разработка лазерных технологий модуляции иммунного ответа» (2006); компанией «Pfizer», США – «Лазерные адьюванты вакцин» (2008-2011); Национальным Институтом Здоровья США – проекты RC1DA028378 «Лазерные адьюванты вакцины от никотиновой зависимости» (2009-2011) ; R01AI105131 «Применение лазеров в ближнем ИК диапазоне вместо химических адьювантов вакцин» (2013-2017); 2R42AI1140-12-02 «Разработка лазерной системы ближнего ИК-диапазона для повышения эффективности вакцин (2014-2018). Агентством Передовых Оборонных Исследовательских Проектов США – № 66001-101-2132 «Применение лазеров для повышения эффективности противогриппозной вакцины» (2010-2012); фондом Билла и Мелинды Гейтс – OPP1046276 «Разработка вакцины от полиомиелита на основе лазерных технологий» (2011-2013). Национальным Институтом Аллергии и Инфекционных Болезней США – 1R01AI089779 «Повышение эффективности противогриппозной вакцины без введения адьювантов» (2011-2016).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы научного исследования

Работа выполнена в ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны РФ. Исследование проводилось в период с февраля 1996 по сентябрь 2017 года. Экспериментальные исследования выполнены на 3450 белых мышах линии СВА, 240 мышей линии Balb, 120 мышей линии СЗН/HeJ (без TLR4 - рецепторов), 380 крыс линии Вистар из питомников РАН и РАМН «Рапполово» и «Пушино».

Клинические исследования выполнены у 326 сотрудников нефтеперерабатывающего предприятия (г. Кириши Ленинградской области), 136 больных язвенной болезнью желудка. Группа контроля – сотрудники строительного концерна «Титан-2», Ленинградская область (116 чел). В 442 ОВКГ, клиниках общей терапии №1 и военно-полевой терапии ВМА им. С.М. Кирова проводили обследование и лечение 56 больных длительно не рубцующимися (более двух месяцев) язвами желудка и 136 пациентов с обычным течением язвенной

болезни. Лазером на парах меди облучали периульцерозную зону через инструментальный канал эндоскопа. Основная группа – 29 чел., группа контроля – 27 чел. Плотность потока энергии 1,5 Вт/ см², время облучения 60–120с, два сеанса в неделю (2–7 на курс лечения). БТШ70 определяли в биоптатах слизистой оболочки желудка в зоне облучения с использованием набора антител лаборатории защитных механизмов клетки института цитологии РАН. Обследование больных включало общеклинические, биохимические и инструментальные методы диагностики заболеваний органов пищеварения в соответствии с общепринятыми стандартами.

БТШ70 получен из лаборатории защитных механизмов клетки НИИ цитологии РАН. Модификацию БТШ70 осуществляли путем его конъюгации с полиэтиленгликолем и слияния с Fc-фрагментом IgG человека (патенты США 9217018; 9937241). Бактериальные ЛПС модифицировали путем электронно-лучевой обработки исходного сырья с последующим фракционированием методом ультрафильтрации (патент РФ №2662916).

Методы оценки защитных свойств модифицированных биомишеней, БТШ70 и их индукторов

Защитный эффект продуктов лазерной активации дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae* (ПЛАДК), мЛПС, внеклеточных БТШ70 и их индукторов изучали на моделях радиационных, химических поражений и действия биопатогенов у мышей линии СВА и СЗН/НеJ. Радиационные поражения вызывали общим γ -облучением (5,5; 6,5; 10,0 Гр), химические – острой (однократно 250 мг/кг) и хронической (10 и 20 мг/кг – 10 и 20 сут) интоксикацией циклофосфаном. Защитный эффект мЛПС и БТШ70 изучали также на моделях токсического отека легких, вызываемого ингаляционной интоксикацией фосгеном в токсодозе 4,0 мг×мин/л, геморрагического отека легких, вызываемого интраназальным заражением патогенным для мышей вирусом гриппа H3N2(3 ЛД₅₀) и эндотоксического шока. Эндотоксиновый шок вызывали введением внутрибрюшинно бактериального ЛПС(1-7 ЛД₅₀) *Serratia marcescens*- продигозана (ЛД₅₀= 4,0 мг/кг).

ПЛАДК применяли перорально в течение 28 сут после облучения (интоксикации циклофосфаном), 14 сут после заражения мышей вирусом гриппа H3N2 (для сравнения за 24 ч и 1 ч до заражения вводили ремантадин в дозе 70,0 мг/кг). Модифицированный пучком электронов (150 кГр) ЛПС – мЛПС (0,1 ЛД₅₀), БТШ70 (20 мкг) вводили внутрибрюшинно за 30 мин до и через 30 мин после облучения, или через 24 ч после интоксикации циклофосфаном с последующим ежедневным введением в течение 4 сут.

Для защиты от эндотоксического шока применяли мЛПС (0,1 ЛД₅₀) за 1 ч до введения ЛПС *Serratia marcescens*. БТШ70 (50 мкг на мышь) вводили внутрибрюшинно за 10 мин до инъекции летальных доз ЛПС.

Критерием защитного эффекта ПЛАДК, мЛПС и БТШ70 служили выживаемость, продолжительность жизни мышей после облучения (интоксикации), динамика изменений массы тела, гематологических показателей и иммунного статуса. Исследования крови проводили на 7, 14, 21 и 28 сут после облучения или интоксикации. Изменения клеточного иммунитета оценивали по данным РТМЛ с Кона, Г-КСФ, ЛПС. В лимфоцитах определяли активность СДГ и ЛДГ. «Респираторный взрыв» в нейтрофилах крови определяли путем хемилуминометрии. Оценивали изменения массы селезенки мышей; морфометрию биоптатов, иммуногистохимические исследования проводили с помощью световой микроскопии. В клетках и сыворотке крови определяли БТШ70 иммуноферментным способом и методом иммуноблотинга.

Для защиты от летальной гриппозной инфекции и ингаляционного отравления фосгеном вводили мЛПС (0,1 ЛД₅₀) и БТШ70 (50мкг/мышь) через 10 мин после заражения или интоксикации, затем ежедневно в течение 4 суток мышам линии АВС (n=150) вводили внутрибрюшинно мЛПС (0,1 DL₅₀), БТШ70 (50 мкг/мышь), БТШ70-ПЭГ или

БТШ70-Fc. Животные были разделены на 5 групп (n=20). Животным 1 группы вводили рекомбинантный БТШ70, 2 группы – БТШ70-ПЭГ, 3 группы – БТШ70-Fc, 4 группы (контроль) – физиологический раствор в том же объеме, 5 группа – интактные животные. Выраженность отека легких определяли по величине легочного коэффициента (ЛК) $ЛК = \frac{\text{масса легких}}{\text{масса животного}} \times 1000$.

В плазме крови мышей определяли уровень цитокинов – ИЛ-6, ИЛ-10, HMGB1 (амфотерина) (иммуноферментный анализ на анализаторе Personal LAB, Adaltis, Италия с использованием специфических компонентов к цитокинам мышей фирмы «R&D Systems», США). ЛДГ в крови определяли на анализаторе SAPHIRE-400 (Tokyo Boeki Ltd., Япония). Число CD3⁺; CD3⁺CD8⁺; CD3⁺CD8⁺PD1⁺; CD3⁺CD8⁺Tim-3⁺; CD3⁺CD8⁺PD1⁺Tim-3⁺ лимфоцитов в крови определяли методом проточной цитометрии (Cell Lab Quanta™ SC, “Beckman Coulter”, США) с использованием мышиных антител фирмы Biolegend (США). Гранзим В определяли в лимфоцитах методом иммуноцитохимии с использованием антител фирмы Abcam (США), морфометрической программы и критерия H-Score (Патент РФ № 2662916).

Для повышения устойчивости к кровопотере, защиты от травматического токсикоза и от развития декомпрессионной болезни крысам линии Вистар вводили внутрибрюшинно БТШ70 (100 мкг на крысу), БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc. Животных разделяли на 5 групп (n=20). Крысам 1-ой группы вводили БТШ70, 2-ой – БТШ70-ПЭГ, 3-ей – БТШ70-Fc, 4-ой – физиологический раствор в том же объеме (контроль), 5 группа – интактные животные. Препараты вводили ежедневно в течение 3 сут. до массивной кровопотери или сразу после прекращения компрессии мягких тканей обоих бедер. Кровопотерю моделировали путем забора крови через катетер в хвостовой артерии – 2 мл/мин до достижения среднего АД = 30±5 мм. рт.ст., которое поддерживали на этом уровне в течение 60 мин. Раствором Рингера восполняли 200% от кровопотери в течение 60 мин., затем определяли выживаемость и продолжительность жизни крыс. Травматический токсикоз моделировали 6-часовым сдавливанием мягких тканей бедра крыс в специальных тисках площадью 5 см². Сила компрессии – 5 кг/см². Выживаемость крыс определяли через 24 ч после кровопотери и через 7 сут. после компрессионной травмы. Пробы крови забирали через 24 ч после кровотечения или декомпрессии, в них определяли калий, креатинин, АлТ, АсТ, КФК определяли на анализаторе SAPHIRE-400, Япония. Защитный эффект БТШ70, БТШ7-ПЭГ и БТШ70-Fc изучали на модели декомпрессионной болезни у белых крыс самцов (n=100) массой тела 190–240 г. БТШ70 и его производные вводили внутрибрюшинно (50 мкг на крысу) через 3–5 мин после изъятия животных из барокамеры. Животных подвергали воздействию повышенного давления воздуха (750 кПа, экспозиция 90 мин) в барокамере. По завершении изопрессии проводили безостановочную декомпрессию со скоростью 200 кПа/мин. В течение 30 мин после изъятия животных из барокамеры оценивали состояние животных. Регистрировали поведенческие реакции и исследовательскую активность животных в пробе «открытое поле» через 1 сутки с использованием аппарата «Actimot2/МоTiL2» фирмы «TSE» (Германия). Работоспособность животных оценивали через 1 сутки эксперимента с использованием прибора «Rota-Rod/RS Harvard» фирмы «PanLab», США).

Влияние БТШ70 на показатели физической работоспособности при экстремальных физических нагрузках определяли по показателю максимального времени бега на тредбане «до отказа», нагрузочные пробы проводили ежедневно или через сутки в течение 19 сут. БТШ70, ПЭГ-БТШ70 и Fc-БТШ70 (50, 100 мкг/животное) вводили внутрибрюшинно через 5 мин после завершения физической нагрузки. По завершении исследований в крови определяли содержание КФК, ЛДГ, ИЛ6, ИЛ10 (патент США № 9616100). Эффективность применения лазерного излучения для повышения защитной активности вакцины «Ваксигрип» s изучали при сочетании действия лазера на вентральную поверхность кожи ушной раковины мышей с внутрикожным введением вакцины. Для сравнения вводили 50 мкг БТШ70 внутрикожно в область введения вакцины перед вакцинацией. Параметры лазера $\lambda = 510$ нм и 578 нм;

экспозиция 120–180 с, $P=0,5-3,0 \text{ Вт/см}^2$. Титр противогриппозных антител определяли через 28 сут после вакцинации, РТМЛ с КонА, ФГА и вакциной определяли через 48 ч, 7, 14, 21, 28 сут после вакцинации. БТШ70 в коже уха мышей определяли после облучения с помощью иммуногистохимических реакций и иммуноблоттинга. Число и активность клеток Лангерганса кожи определяли гистохимически (В.М.Быков, 1997) и путем электронной микроскопии (Европатент EP-2341932, патент США №10062376). Электрофильные ксенобиотики и хлорированные углеводороды в биосредах и воде определяли на газовом хроматографе «Кристалл-2000», детектор электронного захвата, и на хроматомасс-спектрометре фирмы «Agilent». Концентрат экотоксикантов получали трехкратным вымораживанием из водопроводной воды с последующей лиофильной сушкой. Восстановленный глутатион определяли по G. Ellman (1959), ГП – по А.Н. Гавриловой, Н.Ф. Хмара (1986), ГР – по I. Carlberg, В. Mannervik (1985), СДГ; ЛДГ; Г6ФДГ – по Р.П. Нарциссову (1970), маркеры эндогенной токсемии – по М.Я. Малаховой (1996).

Методы статистического анализа полученных данных

Результаты исследований обрабатывали методами вариационной статистики с определением средней арифметической (M), средней ошибки средней арифметической (m), среднего квадратического отклонения (δ). Для определения достоверности различий вычислялся доверительный коэффициент Стьюдента (t), точный критерий Фишера, критерий Манна - Уитни и величина вероятности (p). Статистическая обработка проводилась с использованием программы "Statistica 5.0", электронных таблиц "Microsoft Excel".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка и оценка эффективности средств защиты от экстремальных воздействий полученных на основе лазерных, радиационных и биологических технологий

Установлено, что для получения средств перекресной защиты от радиационных, токсических поражений и биопатогенов активирующие физические воздействия должны быть высокоинтенсивными, чтобы вызвать универсальную защитную реакцию клеточного стресса, но кратковременными (импульсными), чтобы не вызывать летальных повреждений клеток. Этим требованиям соответствует импульсно-периодическое излучение лазера с пиковой мощностью 1-10 Квт.

Доказано, что эффективным путем физической модификации биомишеней (бактериальных ЛПС, растительных полисахаридов, вируса гриппа, парамиксовируса Сендай) является их обработка пучком электронов (широкоапертурный ускоритель).

Для лечения БТШ-зависимых патологических состояний получены рекомбинантные БТШ70 и их производные пролонгированного действия – БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc.

Оценка эффективности модификации биообъектов

Установлено, что облучение CO_2 -лазером ($0,5-1,0 \text{ кВт/см}^2$) дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae* вызывает секрецию БТШ70 в культуральную среду. После лазерной активации дрожжевой культуры уровень БТШ70 повышался в ней более чем в 5 раз. БТШ70 повышался в 2,1–11,6 раз в культуральной среде после воздействия ультразвука (30 Вт/см^2 , экспозиция 1–3 мин), инфразвука (90–150 дБ, 16 Гц, экспозиция 10 мин, длительность импульса 200–600 мс) пропускания ее под давлением через профилированные сопла ($0,3-1,1 \text{ МПа}$, угол раскрытия 15–60°).

Облучение CO_2 -лазером капельной струи с полисахаридами водного экстракта исландского мха и морской травы *Zetraria* вызывало замещение высокомолекулярных (80–400 кД) на низкомолекулярные (менее 10 кД) фракции. Их уровень возрастал на 40% при интенсивности излучения на капле $0,9 \text{ Вт/см}^2$. Обработка пучком электронов (50–150

кГр) в 18–25 раз повышало содержание низкомолекулярных фракций ЛПС с молекулярной массой 1,0–1,5 и 3,0–5,0 кДа.

«Время жизни» в сыворотке крови у пегелированных форм БТШ70 и БТШ70-Fc было в 10 - 50 раз больше, чем у исходного БТШ70.

Оценка защитных свойств модифицированных микробных липополисахаридов и рекомбинантных белков теплового шока-70

Защита от эндотоксического шока

Защитные свойства мЛПС оценивали на модели септического шока, вызываемого ЛПС *Serratia marcescens*. Результаты исследований свидетельствуют о том, что мЛПС защищает мышей от эндотоксического шока вызываемого летальными дозами микробных ЛПС (5 LD₅₀).

Защитный эффект БТШ70 был в 1,5 раза выше (выживаемость - 45%), чем мЛПС, он значительно усиливался при их сочетанном применении (выживаемость-70%).

Высокие показатели выживаемости мышей (85%) линии СЗН/HeJ (без TLR4) после введения летальных доз микробных ЛПС свидетельствует об участии TLR4 в развитии эндотоксического шока и в механизмах реализации защитного эффекта мЛПС (табл.1)

Таблица 1. Защитный эффект мЛПС и БТШ70 при эндотоксическом шоке у мышей

Показатель	Группы животных			
	мЛПС	БТШ70	БТШ70+мЛПС	СЗН/HeJ мыши (без TLR4)
Выживаемость, %	30	45*	70*	85*

Примечание: * - $P \leq 0,01$ по сравнению с группой «мЛПС»

Для уточнения молекулярных механизмов защитного действия мЛПС изучали его влияние на образование АФК в лейкоцитах при воздействии на них бактериальных эндотоксинов- «кислородный взрыв». Бактериальный ЛПС вводили после инкубации клеток с мЛПС, который незначительно активировал «кислородный взрыв». Установлено, что прединкубация клеток с мЛПС существенно снижала вызываемое эндотоксином образование АФК. Предотвращение развития связанных с избыточным образованием АФК патологических состояний может быть одним из механизмов защитного действия мЛПС.

Потенциальными антагонистами бактериальных эндотоксинов могут быть низкотоксичные ЛПС из морских бактерий. Инкубация лейкоцитов человека с ЛПС морской бактерии *Marinomonas Communis* значительно снижала индуцированное ЛПС *E.coli* образование АФК. Эти результаты указывают на возможность использования нетоксичных ЛПС морской бактерии *Marinomonas Communis* для защиты от избыточного образования АФК при воздействии бактериальных токсинов.

Защита от респираторного дистресс-синдрома при высокопатогенном гриппе и ингаляционном отравлении фосгеном у мышей

Установлено, что мЛПС и БТШ70 препятствовали развитию респираторного дистресс-синдрома при высокопатогенном гриппе (H3N2) и ингаляционном отравлении фосгеном у мышей. мЛПС повышал выживаемость мышей при гриппе и токсическом отеке легких до 30 и 50%, соответственно ($P < 0,05$). При ингаляционном поражении фосгеном защитный эффект БТШ70 был более выражен, чем у мЛПС (соответственно 50 и 65%), эффективность применения БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc была 80% и 90 %, соответственно.

После интоксикации фосгеном воспалительный цитокин HMGB1 (амфотерин) повышался в крови в 33,3 ; ИЛ-6 – в 40,3; ИЛ-10 – в 4,2 раза. Коэффициент ИЛ-6/ИЛ-10 составил 84,1; ЛК повысился в 3,5 раза. мЛПС и БТШ70 препятствовали развитию токсического отека легких, снижали ЛК в 1,45-2,3 раза ($P < 0,05$), уменьшали коэффициент ИЛ-6/ИЛ-10 в 44,3 – 66,2 раза ($P < 0,01$).

Таблица 2. Защитный эффект мЛПС, БТШ70 и его производных при ингаляционном поражении фосгеном через 3 сут после начала эксперимента, М±m.

Параметры	Группы животных					
	мЛПС	БТШ70	БТШ70-ПЭГ	БШ70-Fc	Контроль	Интактные
Выживаемость %	50*	65*	80*	90*	10	100
ИЛ-/ИЛ-10	1,79±0,04	1,90±0,07*	1,88±0,06*	1,27±0,03*	84,1±1,9	8,8±0,09
HMGB1 нг/мл	104,8±9,2	109,5±11,4*	89,6±9,6*	75,8±7,4*	216,3±19,8	6,5±0,8
ЛК	15,5±2,6*	13,2±2,4*	12,4±1,4*	9,8±0,7*	22,4±1,5	7,8±0,6
ЛДГ, ЕД/л	2007±410*	2251±425*	1985±430*	1230±545*	3521±495	183,2±10,5

Примечание: * - P < 0,01 в сравнении с контролем

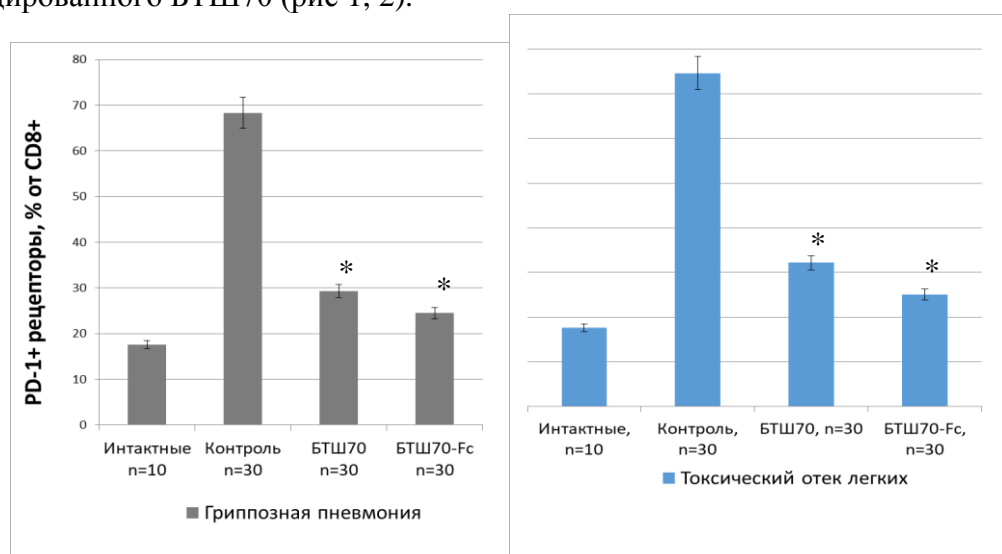
Они снижали концентрацию HMGB1 в плазме крови в 2,1-2,9 раза (P<0,01). Защитный эффект был наиболее выражен при применении БТШ70-Fc (табл. 2). Снижение концентрации HMGB1 в плазме крови ниже 60 нг/мл через 3 суток после интоксикации свидетельствовало с вероятностью не менее 90% о благоприятном прогнозе течения респираторного дистресс-синдрома (токсического отека легких) при ингаляционном поражении фосгеном

Выявлено достоверное повышение числа CD8+ Т-лимфоцитов с «тормозными» PD-1 и Tim-3 рецепторами в периферической крови при заражении мышей высокопатогенным гриппом H3N2 и ингаляционном отравлении фосгеном (рис. 1, 2).

Установлено, что БТШ70 и БТШ70-Fc в 2,3-2,7 раза уменьшали (P<0,01) число CD3+CD8+PD-1+ и CD3+CD8+PD-1+TIM-3+ Т-лимфоцитов в периферической крови у мышей при гриппозной геморрагической пневмонии и токсическом отеке легких при ингаляционном отравлении фосгеном (рис. 1,2).

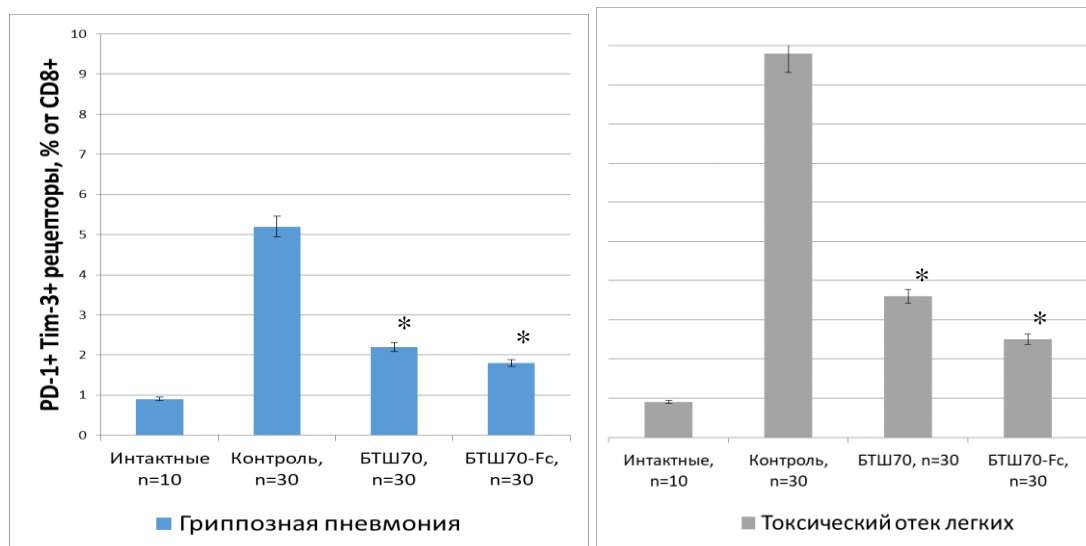
Снижение CD8+ Т-лимфоцитов с «тормозными» PD-1 рецепторами и PD-1+Tim3+ дубль-позитивных Т-лимфоцитов до 20% и 2% от общего количества CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови через 3 суток после интоксикации свидетельствовало с вероятностью не менее 90% о благоприятном прогнозе течения респираторного дистресс-синдрома (токсического отека легких) при ингаляционном отравлении фосгеном у мышей.

Защитное действие БТШ70-Fc было достоверно выше, чем при использовании немодифицированного БТШ70 (рис 1, 2).



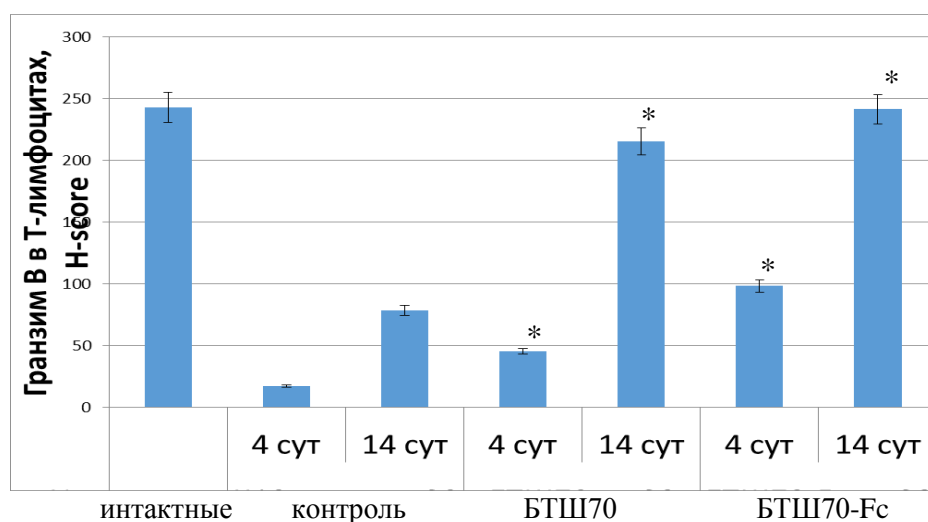
* - P < 0,01 в сравнении с контролем

Рисунок 1. Влияние БТШ70 на число CD8+ Т-лимфоцитов с «тормозными» PD-1 рецепторами в крови у мышей при гриппозной пневмонии и токсическом отеке легких



* - $P < 0,01$ в сравнении с контролем

Рисунок 2. Влияние БТШ70 на число PD-1+Tim-3+ дубль-позитивных CD8+ Т-лимфоцитов в крови у мышей при гриппозной пневмонии и токсическом отеке легких



* - $P < 0,01$ в сравнении с контролем

Рисунок 3. Влияние БТШ70 на уровень «гранзима В» в лимфоцитах при гриппозной пневмонии у мышей

Установлено, что повышение числа CD8+ Т-лимфоцитов с PD-1 и Tim-3 рецепторами сопровождалось резким снижением содержания гранзима В в лимфоцитах периферической крови, что отражает развитие иммунной гипореактивности и анергии («иммунный паралич»).

БТШ70 и БТШ70-Fc препятствовали снижению уровня гранзима В в лимфоцитах периферической крови и ускоряли восстановление его содержания при высокопатогенном гриппе у мышей (рис.3). Повышение содержания «гранзима В» в лимфоцитах коррелировало со снижением числа CD8+ Т-лимфоцитов с ингибиторными PD-1 и Tim-3 рецепторами и восстановлением Т-клеточной иммунной реактивности.

Полученные данные свидетельствуют о том, что БТШ70 и БТШ70-Fc предотвращали развитие респираторного дистресс-синдрома при отравлении фосгеном и высокопатогенной гриппозной инфекции. Защитный эффект БТШ70 и его производных связан с блокадой «тормозных» рецепторов Т-лимфоцитов, нейтрализацией воспалительного цитокина замедленного действия HMGB1 и восстановлением соотношения провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-6/ИЛ-10).

Повышение эффективности вакцинации

Установлено, что экзогенный БТШ70, а также лазерная активация его секреции клетками кожи повышают эффективность вакцины Ваксигрип у мышей.

Они способствовали активации гуморального и клеточного специфического противовирусного иммунного ответа, по данным РТМЛ с вакциной и КонА. Выявлена зависимость адьювантного эффекта лазерного излучения от его экспозиционной дозы (табл.3,4)

Эффект наиболее выражен при внутрикожном введении вакцины в сочетании с БТШ70, а также при сочетании введения вакцины с лазерным облучением кожи в зоне инъекции. При комбинированном введении мЛПС и БТШ70 в сочетании с вакциной получен максимальный адьювантный эффект.

Таблица 3. Титр геагглютинирующих антител к вакцине Ваксигрип через 28 сут после вакцинации

Группы животных	Титр антител через 28 сут после вакцинации ($\log_2 (M \pm 2m)$)
Контрольная группа (вакцина)	2.8 ± 0.3
Вакцина + лазер, экспозиция 1 мин	$4.3 \pm 0.3^*$
Вакцина + лазер экспозиция 2 мин	$5.2 \pm 0.4^*$
Вакцина + экзогенный БТШ70	$4.7 \pm 0.35^*$

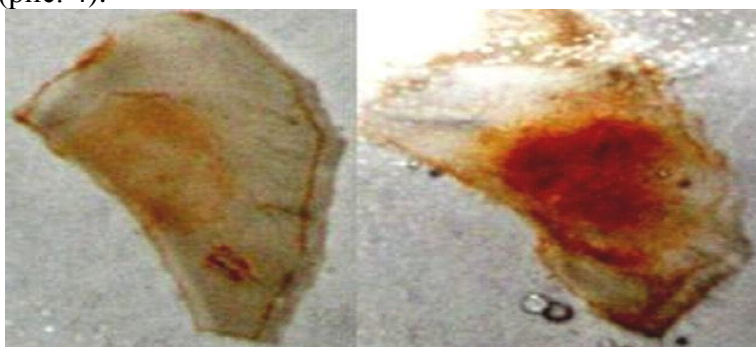
Примечание: * - $P \leq 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 4. Влияние БТШ70, мЛПС и лазерного облучения зоны внутрикожного введения вакцины «Ваксигрип» на показатели клеточного иммунитета у мышей (по данным РТМЛ)

Группа животных, применяемое воздействие	Время исследования после вакцинации, виды антигенов									
	48 ч		7 сут		14 сут		21 сут		28 сут	
	КонА %	В %	КонА %	В %	Кон А %	В %	Кон А %	В %	Кон А %	В %
Вакцина (контроль)	110,6 ±9,4	97,5 ±9,3	102,2 ±8,6	88,6 ±7,2	81,7 ±6,9	72,6 ±6,2	76,4 ±6,4	70,8 ±6,0	69,5 ±5,5	67,5 ±5,2
Вакцина + Лазер	105,1 ±8,8	91,8 ±8,2	76,6 ±6,4*	67,2 ±5,3*	67,8 ±5,4*	59,3 ±4,9*	63,4 ±5,3*	57,3 ±4,6*	61,6 ±4,9*	53,6 ±4,8*
Вакцина + БТШ70	102,0 ±8,1	85,8 ±7,6*	63,9 ±5,1*	57,1 ±4,5*	59,6 ±4,8*	52,6 ±4,3	61,0 ±4,9*	52,4 ±4,4*	60,8 ±4,8*	50,3 ±4,3*
Вакцина + мЛПС	100,1 ±8,2	87,3 ±7,5	60,1 ±4,8*	61,2 ±5,1*	62,5 ±5,1*	55,4 ±4,6*	62,7 ±5,2*	54,7 ±4,4*	61,1 ±5,0*	52,6 ±4,5*
Вакцина + мЛПС + БТШ70	97,5 ±8,8	84,6 ±7,1	59,6 ±4,8*	54,6 ±4,7*	59,1 ±4,9*	49,6 ±4,2*	56,4 ±4,6*	48,4 ±4,1*	54,3 ±4,2*	45,6 ±4,0*

Примечания: * - $P < 0,05$ по сравнению с контролем; КонА-конканавалин А; В – вакцинакј

Лазерное облучение кожи уха мышей дозозависимо повышало уровень внеклеточного БТШ70 в эпидермисе (рис. 4).



Экспозиция 1 мин

Экспозиция 2 мин

Рисунок 4. Изменение содержания БТШ70 в коже вентральной поверхности уха мыши в зависимости от экспозиционной дозы излучения лазера на парах меди.

Это сопровождается миграцией клеток Лангерганса в зону лазерного облучения кожи с их последующей активацией.

Результаты электронной микроскопии свидетельствуют о том, что после «лазерной вакцинации» в зоне облучения активируются фибробласты, в цитоплазме которых образуется множество вакуолей, что отражает активный выброс цитокинов. Затем в зону облучения мигрирует большое число клеток Лангерганса, цитоплазма которых содержит зрелые гранулы Бирбека, в последующем на их месте образуются многочисленные вакуоли, что подтверждает активный выброс этих гранул.

Полученные результаты свидетельствуют о том, повышение эффективности противогриппозной вакцины при лазерном облучении кожи в области ее введения связано с мобилизацией эндогенных БТШ70 в эпидермисе с последующей активацией антигенпредставляющих клеток Лангерганса кожи и их миграцией в зону облучения. Это обеспечивает повышение иммуногенности вакцины при ее введении в зону облучения.

Выявлено, что у мышей, иммунизированных облученным пучком электронов вирусом гриппа H3N2, развивается перекрестный клеточный иммунный ответ на H1N1, H3N2 и H5N1 вирусы гриппа (табл. 5).

Таблица 5. Развитие перекрестного иммунного ответа на H3N2, H1N1 и H5N1 антигены через 28 суток после введения вакцины «Ваксигрип» модифицированной пучком электронов в дозе 25-100 кГр, по данным РТМЛ с целевыми антигенами

Используемые в РТМЛ антигены	Контрольная группа животных, n= 36	Показатели РТМЛ через 28 сут после внутрикожного введения вакцины «Ваксигрип», 20 мкг/мышь, %			
		Интактная вакцина, n=12	Облученная пучком электронов вакцина, доза		
			25кГр, n=15	50кГр, n=14	100кГр, n=12
H3N2	92,4±7,1	87,5±8,9	48,6±5,4*#	57,5±6,5*#	74,7±6,7
H1N1	87,5±7,3	98,7±9,3	59,4±7,6*#	62,7±5,9*#	83,5±7,6
H5N1	95,3±9,8	99,5±10,1	64,1±7,9*#	68,5±8,1*#	91,1±6,4

Примечание: *- P≤0,05 в сравнении с группой контроля, # P≤0,05 в сравнении с группой с введением интактной вакцины «Ваксигрип».

Эффективность противовирусной защиты при летальной гриппозной инфекции у мышей, вызванной вирусом H3N2 достоверно повышалась при совместном применении модифицированных пучком электронов вакцины «Ваксигрип» и парамиксовируса Сендай (штамм «Москва») за 14 сут до заражения.

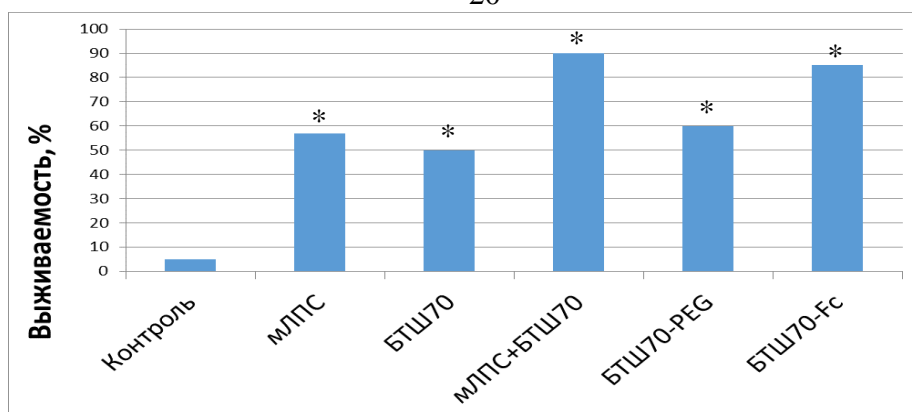
Титр вводимого вируса Сендай составил 10^7 эмбриональных инфицирующих доз 50% (ЭИД₅₀).

При изолированном применении радиомодифицированной вакцины «Ваксигрип» выживаемость составила 55%, модифицированного пучком электронов вируса Сендай - 70% а при их сочетанном применении - 90% (P<0,05).

Защита от радиационных поражений

Оценка защитных свойств мЛПС, БТШ70, БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc при общем γ -облучении показала, что у животных, получавших мЛПС через 30 мин после облучения в дозе 10 Гр, выживаемость составила 56%, БТШ70-50%, БТШ70-Fc – 75%; сочетание мЛПС и БТШ70 – 83% (рис 5).

Изолированный прием мЛПС и БТШ70 препятствовал развитию лейкопении на 7 и 14 сут после облучения в дозе 6,5 Гр и интоксикации циклофосфаном. Максимальный защитный эффект выявлен при сочетанном применении мЛПС и БТШ70 (табл. 6).



* - $P < 0,01$ в сравнении с контролем

Рисунок 5. Влияние МЛПС, БТШ70 и их производные на выживаемость мышей при общем γ -облучении в дозе 10 Гр (*- $P < 0,05$ в сравнении с контролем)

Таблица 6. Количество лейкоцитов в крови мышей ($n=10$) после общего γ -облучения в дозе 6,5 Гр, острой и хронической интоксикации циклофосфаном в различные сроки наблюдения

Группы животных, вводимые препараты		Кол-во лейкоцитов, $\cdot 10^3$ /мкл / Время наблюдения, сут			
		7 сут	14 сут	21 сут	28 сут
Общее гамма-облучение, 6,5 Гр	Контрольная группа	0,32±0,04	0,61±0,09	1,84±0,31	2,22±0,40
	МЛПС	0,48±0,04	1,27±0,31	4,80±0,52*	5,63±0,54*
	БТШ70	0,56±0,05	1,63±0,35*	5,10±0,55*	5,90±0,52*
	МЛПС+БТШ70	0,68±0,05*	7,15±0,71*	6,80±0,57*	6,83±0,55*
Острая интоксикация ЦФ	Контрольная группа	0,15±0,03	0,35±0,04	0,85±0,06	1,92±0,18
	МЛПС	0,89±0,07*	1,45±0,15*	4,26±0,35*	4,93±0,54*
	БТШ70	1,97±0,15*	1,75±0,16*	4,31±0,35*	5,22±0,58*
	МЛПС+БТШ70	1,90±0,15*	7,32±0,58*	5,40±0,49*	6,10±0,55*
Хроническая интоксикация ЦФ	Контрольная группа	0,09±0,03	0,21±0,04	0,86±0,06	2,36±0,18
	МЛПС	0,94±0,08*	1,78±0,16*	3,94±0,32*	3,78±0,34*
	БТШ70	1,06±0,06*	2,11±0,12*	4,42±0,25*	4,95±0,27*
	МЛПС+БТШ70	1,54±0,13*	6,91±0,55*	6,35±0,52*	6,25±0,53*
	Интактные	6,20±0,30	6,0±0,25*	6,15±0,20	6,05±0,30*

Примечание: * - $P \leq 0,05$ в сравнении с группой контроля

Результаты РТМЛ свидетельствуют о том, что общее γ -облучение подавляет клеточный иммунитет и препятствует активации лейкоцитов в ответ на воздействие ЛПС и Г-КСФ. Чувствительность лейкоцитов к ЛПС и Г-КСФ наиболее эффективно восстанавливалась у животных, получавших БТШ70-Fc в сравнении с БТШ70 и БТШ70-ПЭГ(табл. 7).

Таблица 7. Влияние БТШ70 и его производных пролонгированного действия на показатели РТМЛ с через 7 суток после общего γ -облучения в дозе 6,5 Гр

Группы животных	РТМЛ, % от контроля		
	Кона	ЛПС	Г-КСФ
Интактные	110,0±13,6	120,0±16,4	98,6±15,3
Контроль	143,8±9,2	132,8±8,9	156,3±11,0
БТШ70	92,5±9,7*	88,1±8,3*	78,5±6,8*
БТШ70-PEG	79,4±9,7*	71,5±7,7*	75,6±9,8*
БТШ70-Fc	67,6±6,3*	65,2±5,5*	60,7±8,5*

Примечание: * - $P < 0,05$ в сравнении с группой контроля

Установлено, что БТШ70 и МЛПС препятствовали снижению массы селезенки, которое было наиболее выражено в группе контроля на 4–7 сут после общего γ -облучения в дозе 6,5

Гр. Полученные результаты свидетельствуют о том, что БТШ70, БТШ70-ПЭГ, БТШ70-Fc и мЛПС препятствовали развитию миелосупрессии и иммунных нарушений, а также повышали выживаемость подопытных животных после воздействия общего γ -облучения.

Цитопротективный эффект усиливался при сочетанном применении мЛПС и БТШ70. Одним из механизмов их защитного эффекта является повышение чувствительности лейкоцитов к ЛПС и Г-КСФ (по данным РТМЛ).

Установлено, что стресс-активация клеточных культур – облучение CO₂-лазером дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae* (0,5–1,0 кВт/см²) вызывает секрецию в культуральную среду защитных белков стресса и повышение уровня БТШ70 более чем в 5 раз. Выявлен защитный эффект профилактического приема продуктов лазерной активации дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae* (ПЛАДК) при общем γ -облучении в дозе 5,5 Гр – достоверное повышение выживаемости у мышей до 93 % (группа контроля – 53 %).

ПЛАДК достоверно предотвращал вызываемые общим γ -облучением нарушения аэробных и анаэробных механизмов энергообеспечения лейкоцитов (СДГ и ЛДГ), развитие функциональной недостаточности клеточного звена иммунитета (РТМЛ с КонА, ЛПС и Г-КСФ), активацию перекисных процессов (НСТ-тест).

Защита от геморрагического шока, травматического токсикоза, декомпрессионной болезни и повышение устойчивости к интенсивным истощающим физическим нагрузкам

Установлено, что БТШ70 и его производные пролонгированного действия повышали выживаемость крыс при острой массивной кровопотере (ОМК) и травматическом токсикозе.

БТШ70, БТШ70-PEG и БТШ70-Fc достоверно повышали выживаемость при ОМК, до 55 %, 80 % и 90 %, соответственно, что в 3,9–6,5 раз превышало показатели группы контроля (15%). При травматическом токсикозе БТШ70, БТШ70-PEG и БТШ70-Fc достоверно повышали выживаемость крыс до 50 % (8/20), 65% (13/20) и 90 % (18/20), соответственно, что в 2,5–4,5 раза превышало показатели группы контроля (20 % - 4/20)

БТШ70 и их производные препятствовали развитию системной иммунной воспалительной реакции при ОМК и травматическом токсикозе, снижали соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов ИЛ-6/ИЛ-10 (табл. 8,9).

Таблица 8. Защитное действие БТШ70 через 24 ч после острой массивной кровопотери у крыс

Параметры	Группы животных				
	БТШ70	БТШ70-ПЭГ	БТШ70-Fc	Контроль	Интактные
Выживаемость	55% *	80% *	90% *	15%	100%
ИЛ-6, пг/мл	438± 55 *	406± 55*	359± 44*	2230±264	37±2
ИЛ-10, пг/мл	183± 408 *	226± 37*	254±408*	28± 7	7± 1
ИЛ-6 / ИЛ-10	2,4 *	1,8 *	1,4 *	77,0	5,1
Креатинин, мкмоль/л	145± 5 *	129±5*	108± 5*	170±6	75±5
АлТ, Ед/л	440±50 *	413±49*	396±46*	1019±179	47± 2
АсТ, Ед/л	470±45 *	415± 47*	347± 46*	1149±166	65± 3
КФК, Ед/л	758±67 *	633± 58*	514±50*	8681±213	100±6

Примечание: * - $P \leq 0,05$ по сравнению с контролем

Маркерами поражения органов-мишеней: сердца, печени, почек и рабдомиолиза при ОМК и травматическом токсикозе являются повышение уровня АлТ, АсТ, КФК, креатинина, азота мочевины, калия, ЛДГ.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что БТШ70 и его производные защищали органы-мишени от поражений при ОМК и травматическом токсикозе.

Защитный эффект БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc был достоверно более выражен в сравнении с БТШ70 (табл. 8, 9).

Таблица 9. Защитное действие БТШ70 при длительном сдавлении мягких тканей бедра у крыс через 24 ч после травмы, $M \pm m$

Параметры	Группы животных				
	БТШ70	БТШ70-ПЭГ	БТШ70-Fc	Контроль	Интактные
Выживаемость, %	50*	65*	90*	20	100
ИЛ-6, пг/мл	1238±54*	965±105*	859±43*	3245 ± 387*	67±4
ИЛ-10, пг/мл	283±41*	327±57*	456±80*	108±14*	21±2
ИЛ-6/ИЛ-10	5,33*	2,97*	1,89*	30,04**	5,14
Азот мочевины, г/л	43,5±5,2*	39,2±5,6*	31,5±5,7*	59,7±7,4*	13,7±2,2
Калий, ммоль/л	5,44±0,31*	5,73±0,29*	5,21±0,52*	7,12±0,33*	4,25±0,23
Креатинин, г/л	0,84±0,09*	0,75±0,09*	0,59±0,11*	1,28±0,30*	0,32±0,04
АлТ, ЕД/л	1939±155*	1512±109*	1295±195*	4538±295*	76±9
Аст, ЕД/л	654±39*	516±66*	486±75*	720±165*	64±7
КФК, ЕД/л	8758±766*	6632±849*	5214±747*	14620±972*	258 ±65
ЛДГ, ЕД/л	3851 ±738*	3118 ±710*	2830 ±658*	5989 ±695*	210 ±9

Примечание: * - различия статистически значимы при $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что БТШ70 значительно повышал продолжительность жизни при геморрагическом шоке (в 3,4–5,1 раза). Защитный эффект у препаратов БТШ70 пролонгированного действия (БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc) более выражен в сравнении с немодифицированным рекомбинантным БТШ70 (табл.10).

Таблица 10. Влияние БТШ70, БТШ70-ПЭГ, БТШ70-Fc на продолжительность жизни при геморрагическом шоке у крыс $M \pm m$

Показатели	Группы животных			
	БТШ70	БТШ70-ПЭГ	БТШ70-Fc	Контроль
Продолжительность жизни, мин	235±45*	278±49*	348±35*	69±9

Примечание: * - различия статистически значимы при $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

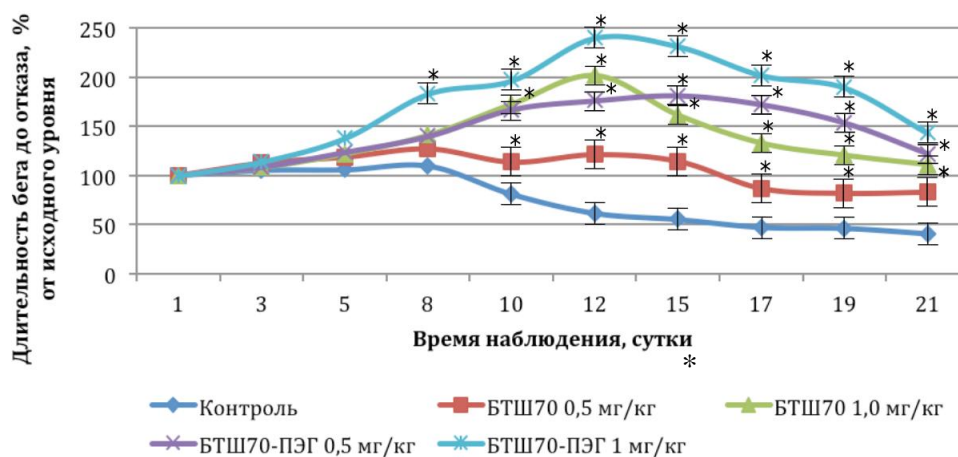
Полученные данные свидетельствуют о том, что БТШ70 и его производные препятствовали развитию клинических проявлений декомпрессионной болезни (ДКБ) при моделировании глубоководных погружений у экспериментальных животных. Признаки острой ДКБ в контрольной группе встречались в 73,3% случаев, а у крыс, получавших БТШ70 – в 45,6% ($P < 0,05$). БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc снижали частоту возникновения и выраженность клинических проявлений ДКБ в 2,5-3,4 раза ($P < 0,01$). Реакции адаптации при барокамерной симуляции экстремальных глубоководных погружений сопровождались повышением БТШ70 в сыворотке крови в 3-11 раз ($P < 0,01$).

Защитный эффект БТШ70-Fc был более наиболее выражен в сравнении с БТШ70 и БТШ70-ПЭГ. БТШ70 и его производные пролонгированного действия являются перспективными средствами активации реакций адаптации при экстремальных глубоководных погружениях, профилактики и лечения ДКБ.

Установлено, что интенсивные истощающие физические нагрузки снижают более чем на 60 % показатели физической работоспособности в сравнении с исходными через 5–10 сут после начала эксперимента, а также значительно повышают уровень КФК, ЛДГ, ИЛ6 в крови крыс. Это свидетельствует о развитии повреждений клеточных мембран миоцитов при

интенсивных истощающих физических нагрузках и указывает на роль провоспалительных цитокинов в их патогенезе.

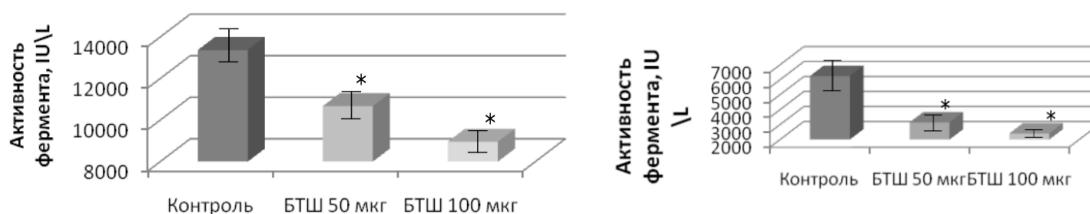
При экстремальных физических нагрузках экзогенный БТШ70 повышал работоспособность более, чем в 2 раза в сравнении с исходными показателями, БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc - в 2,5–3,1 что достоверно превышает показатели, полученные при введении БТШ70.



* - $P < 0,01$ в сравнении с контролем

Рисунок 6. Сравнительный анализ влияния БТШ70 и БТШ70-ПЭГ на работоспособность крыс, тест длительность бега на тредбане «до отказа», нагрузки через день

Выявлено, что БТШ70 и БТШ70-ПЭГ достоверно снижали в крови у крыс уровень КФК и ЛДГ (рис. 7) и концентрацию ИЛ6, а уровень ИЛ10 оставался повышенным.



* - $P < 0,01$ в сравнении с контролем

Рисунок 7. Активность КФК(слева) и ЛДГ (справа) в сыворотке крови крыс на 10 сутки эксперимента (тест «Бег до отказа» на тредбане).

Морфологический анализ выявил в бедренных мышцах крыс группы контроля признаки дистрофии, рабдомиолиза и асептического воспаления.

В мышцах крыс основных групп обнаружены признаки активации ангиогенеза, лимфокапиллярной системы и присутствия в лимфатических капиллярах большого числа активированных широкоцитоплазматических лейкоцитов.

Эти изменения были наиболее выражены у животных, получавших БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc. Они активировали репаративные процессы в поврежденных при интенсивных физических нагрузках миоцитах

Молекулярные механизмы защитного эффекта экзогенных БТШ70 и их конъюгатов с полиэтиленгликолем включают увеличение плотности капиллярной сети, восстановление целостности мембран миоцитов и мобилизацию сателлитных стволовых клеток мышц (табл. 11).

По данным морфометрии биоптатов БТШ70 дозозависимо увеличивл плотность капиллярной сети миоцитов (в 1,7–3,7 раз) по сравнению с группой контроля, повышал число

сателлитных клеток мышц (в 6,8–7,9 раз). БТШ70-ПЭГ увеличивал плотность капиллярной сети в 1,9–3, 8 раза, число сателлитных клеток – в 7,1–8,6 раз, а БТШ70-Fc в 3,5–3,8 раз и 7,5–9,2 раза, соответственно (табл. 11).

Таблица 11. Влияние БТШ70 и БТШ70-ПЭГ на плотность капиллярной сети и числа сателлитных клеток в мышце бедра крыс после теста «Бег до отказа» на тредбане, ежедневные нагрузки

Группы Животных	Доза, мг/кг	Параметры	
		Плотность капиллярной сети (число капилляров в мм ²)	Сателлитные клетки мышц (% от контроля)
Контроль		275,0±21,2	100
Метапрот	20	310,4±63,3	148,6±56,4*#
БТШ70	0,25	907,5±37,4*#	680,2±150,3*#
	05	990,3±27,4*#	723,4±145,4*#
	1,0	1005,4±38,4*#	791,5±138,3*#
	1,25	981,8±25,7*#	736,2±141,2*#
БТШ70-ПЭГ	0,25	951,2±41,3*#	706,1±132,5*#
	05	1020,6±39,8*#	840,1±170,4*#
	1,0	1042,8±39,7*#	863,2±152,4*#
	1,25	947,5±38,6*#	811,6±146,8*#
БТШ70-Fc	0,25	986,7±40,7*#	753,2±151,4*#
	05	1038,3±32,3*#	886,4±160,6*#
	1,0	1052,4±43,5*#	921,3±168,5*#
	1,25	990,3±42,8*#	823,4±130,4*#

Примечания: * - P<0,05) в сравнении с группой контроля; # - P<0,05 в сравнении с группой метапрот

Коррекция иммунных и метаболических нарушений при длительном воздействии экотоксикантов на организм экспериментальных животных

Для изучения влияния длительного воздействия малых доз экотоксикантов на организм экспериментальных животных применяли сухой концентрат, который был получен из водопроводной воды в г. Кириши путем ее многократного вымораживания и лиофильной сушки. Мыши получали с питьевой водой в течение 9 мес этот концентрат в дозе 0,5–60 мг/л. Выбор диапазона концентраций ксенобиотиков основан на реальном среднем содержании органических соединений в питьевой воде 11,8±2,4 мг/л (6–15 мг/л в зависимости от времени года). Установлено преимущественное депонирование экотоксикантов в сальнике, печени, селезенке и слизистой оболочке кишечника.

Средняя продолжительность жизни мышей уменьшалась на 36,9±3,2% при концентрации ксенобиотиков в питьевой воде 60 мг/л. В I фазе хронической интоксикации выявлен рост числа лейкоцитов, лимфоцитов и активация Т-клеточного звена иммунитета. Во II фазе интоксикации снижлось число лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов.

Результаты исследования интенсивности «кислородного взрыва» в условиях хронической интоксикации ксенобиотиками показали, что в I фазе интоксикации повышаются показатели «кислородного взрыва» лейкоцитов в 1,3–2,8 раза, а во II фазе они, наоборот, снижались. Изменения НСТ-теста, ЛДГ и СДГ соответствовали динамике

показателей «кислородного взрыва». В первой фазе интоксикации повышался уровень ЛДГ, СДГ, а-ГФДГ в лимфоцитах, а во второй фазе он, наоборот, снижался. Содержащиеся в питьевой воде ксенобиотики дозозависимо уменьшали продолжительность гексеналового сна в первой фазе интоксикации на 25-90%. Во второй фазе (240-270-е сут), наоборот, его продолжительность увеличивалась на 28%-86% ($P < 0,05$). Уменьшение продолжительности гексеналового сна указывает на активацию, а увеличение – на подавление активности ферментов антитоксического ответа.

Изучение изменений содержания цитокинов в плазме крови и культуре моноцитов периферической крови, после их инкубации в течение 24 ч в присутствии и отсутствии ЛПС показало, что в первой фазе интоксикации повышался базальный уровень и ЛПС-стимулированная секреция ИЛ-10 (в 1,3-5,2 и 1,5-2,0 раза), ИЛ-6 и ФНО (в 1,4-2,7 и 1,7-3,1 раза).

Во второй фазе интоксикации сохранялось повышение ИЛ-6 и ФНО в крови в 1,3-1,6 раза при одновременном снижении ИЛ-10 в 2,1-3,6 раза.

Во второй фазе развивалась резистентность к стимуляторам: ЛПС-стимулируемая секреция ИЛ-6 и ФНО снижалась в 2,6-4,3, а ИЛ-10 – в 2,1-3,3 раза. Это коррелировало с динамикой изменений системы глутатиона в эритроцитах и печени мышей: активация в первой и подавление во второй фазе

Наиболее выраженными метаболическими и иммунными нарушениями в первой фазе интоксикации были активация «кислородного взрыва» в нейтрофилах, ЛДГ и СДГ в лимфоцитах, ферментов антитоксического ответа (уменьшение продолжительности гексеналового сна, ГР, ГП, Г6ФДГ), активность ЛДГ и СДГ в лимфоцитах.; показателей клеточного звена иммунного ответа (РТМЛ с КонА, ЛПС); повышение базального уровня и ЛПС-стимулированной секреции цитокинов в крови. Во II фазе интоксикации эти показатели, наоборот, снижались.

Выявлено повышение стимулированной секреции БТШ70 в крови в 4,8–7,6 раз в первой фазе с последующим снижением или отсутствием ответа на стимуляцию во второй фазе интоксикации.

Двухфазный характер реакций клеточного стресса при хронической интоксикации определяет стратегии разработки средств защиты от поражений при воздействии токсических веществ. В первой стадии интоксикации, которая характеризуется активацией иммунных и метаболических механизмов клеточного стресса применяли мЛПС. Он препятствовал избыточной активации клеточного иммунитета (по данным РТМЛ с КонА, ЛПС), показателей «кислородного взрыва» в лейкоцитах, ферментов микросомального окисления (гексеналовый сон) и а-ГФДГ в лимфоцитах.

Во второй стадии интоксикации оценивали эффективность защитных свойств ПЛАДК и МЭХ (табл. 12).

Таблица 12. Коррекция иммунных и метаболических нарушений во второй фазе интоксикации (60 мг/л) у мышей

Показатели	Интактные животные	Контрольная группа	Средства защиты	
			МЭХ	ПЛАДК
Лейкоциты ($\times 10^9$ /л)	6,70 \pm 0,61	3,28 \pm 0,44	5,14 \pm 0,49*	5,94 \pm 0,45*
Лимфоциты($\times 10^9$ /л)	2,28 \pm 0,58	0,81 \pm 0,08	1,62 \pm 0,19*	2,26 \pm 0,28*
РТМЛ с Кон А	96,5 \pm 7,9	151.3 \pm 12,9	82,4 \pm 11,5*	73,7 \pm 11,7*
РТМЛ с ЛПС	92,4 \pm 12,5	188,9 \pm 21,4	78,7 \pm 15,8*	67,4 \pm 17,2*
СДГ в лимфоцитах	13,56 \pm 0,40	9.43 \pm 0,68	11,88 \pm 0,69*	12,71 \pm 0,70*
ЛДГ в Лф	12,15 \pm 0,28	7,81 \pm 0,54	9,73 \pm 0,62*	10,91 \pm 0,50*
а-ГФДГ в Лф	11,76 \pm 0,78	8,21 \pm 1,33	10,15 \pm 0,64*	10,95 \pm 0,59*
Гексенал. сон, мин	25,4 \pm 1,1	47,8 \pm 2,5	38,2 \pm 3,3*	31,3 \pm 3,1*

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с группой животных получавших экотоксиканты в дозе 60 мг/л

Они препятствовали развитию Т-клеточной иммунной гипореактивности, избыточному образованию АФК в нейтрофилах, снижению показателей НСТ-теста, ферментов микросомального окисления (гексеналовый сон) и а-ГФДГ в лимфоцитах, повышали активность анаэробных механизмов энергетического обеспечения клеток (ЛДГ). Наибольший защитный эффект установлен у ПЛАДК.

Полученные данные свидетельствуют о том, индукция БТШ70 подавляет развитие гипореактивности, способствует коррекции иммунных и метаболических нарушений при экспериментальном экотоксическом стрессе у мышей.

Состояние здоровья , иммунные и метаболические нарушения и их коррекция у сотрудников нефтеперерабатывающего предприятия

Показатели многолетней заболеваемости населения (1996-2010 гг.) свидетельствуют о том, что в Киришском районе Ленинградской области темпы прироста и первичная заболеваемость болезнями органов пищеварения, инфекционными заболеваниями и злокачественными новообразованиями превышают показатели по Ленинградской области, Санкт-Петербургу, РФ, ЛенВО, ЛенВМБ и ВС РФ.

В Киришском районе первичная заболеваемость болезнями органов пищеварения (XI класс) с 1996 по 2010 год повысилась в 2,8 раза (с 24,87 до 69,63‰). В 2002 г. XI класс болезней занял первое место в структуре заболеваемости населения г.Кириши (99,81‰). В 2010 году заболеваемость язвенной болезнью в Киришском районе составила 5,9‰, Ленинградской области – 2,8‰, Санкт-Петербурге – 3,1‰, РФ – 3,6‰ (ЛенВО- 4,7‰, Лен ВМБ- 5,4‰, ВС РФ- 4,6‰). Повышение заболеваемости болезнями органов пищеварения может быть связано с экотоксическими воздействиями. Выявлены сезонные колебания уровня электрофильных ксенобиотиков в питьевой воде г. Кириши – повышение на 74,2–118,7% в осенний и снижение на 65,4–87,7% в весенний период.

Их концентрация в питьевой воде была повышена в 2002 и 2008 гг. на 64,7% и 47,9% в сравнении со среднемноголетними значениями. В этот период отмечали повышение уровня первичной заболеваемости болезнями системы органов пищеварения.

Содержание электрофильных ксенобиотиков в крови зависела от стажа работы на предприятии. Оно было повышено в 2,3–3,5 раз у лиц со стажем работы 5–15 лет и в 5,3–7,8 при стаже работы более 15 лет в сравнении с группой со стажем менее 5 лет.

Базальный уровень БТШ70 в плазме крови сотрудников со стажем работы до 5 лет составил $3,2 \pm 0,7$ нг/мл, 5-15 лет – $5,8 \pm 1,3$ нг/мл, более 15 лет – $2,9 \pm 0,7$ нг/мл (в группе контроля – $2,4 \pm 0,6$ нг/мл). Это свидетельствует о том, что электрофильные экотоксиканты повышают БТШ70 в крови, уровень его снижается при длительности экотоксических воздействий более чем 15 лет. Пробы с гипоксией (ингаляция 10 % кислородно-азотной смеси) выявили повышение способности организма к секреции БТШ70 в кровь у лиц с незначительной и умеренной инкорпорацией электрофильных экотоксикантов (стаж работы до 15 лет) и ее снижение при высокой инкорпорации (стаж работы более 15 лет).

Углубленное медицинское обследование сотрудников ООО «Киришинефтеоргсинтез» проводили в период с 1996 по 2010 г. В 1996 г. обследовали 257 работников, у них выявлено 987 заболеваний. Наиболее часто встречались болезни системы кровообращения (21,4%), органов дыхания (19,3%), органов пищеварения (17,6%) и инфекционные заболевания (17,3%). Хронический гастрит и хронический дуоденит регистрировали в 1,7–1,9 раза чаще, чем в контроле. Сочетание четырех форм патологии в 1,5 раза превышало этот показатель у лиц группы сравнения. У 21% лиц со стажем более 15 лет выявлено 8 сочетаний, у 55% из них установлено 9–16 сочетаний хронических форм соматической патологии. В референтной группе только в 12% случаев были выявлены сочетания 8 форм хронических забо-

леваний. Особенности хронических болезней при экотоксических воздействиях являются частые обострения, затяжное и рецидивирующее течение, развитие иммунометаболических нарушений. Исследование иммунного и метаболического статуса проводили у сотрудников ООО «Киришинефтеоргсинтез» весной (257 человек) и осенью (139 человек) 2006 г. У лиц со стажем до 10 лет выявлено повышение уровня IgG в сравнении с группой контроля. При стаже работы более 10 лет существенно повышается уровень циркулирующих иммунных комплексов.

Выявлен двухфазный характер изменений в системе иммунного надзора организма, который зависел от стажа работы на нефтехимическом предприятии.

Первоначальная активация клеточного, гуморального и неспецифического иммунного ответа сменяется на его торможение. Декомпенсация системы иммунного надзора организма наступает при стаже работы более 15 лет. Проведенное нами проспективное наблюдение (1996-2010 гг.) за показателями здоровья работников ООО «Киришинефтеоргсинтез» выявило у них рост заболеваемости болезнями органов пищеварения. В 27,5% случаев показатели метаболической активности лейкоцитов, «респираторного взрыва», клеточного и гуморального иммунитета были повышены, в 16,2% - снижены.

При повторном исследовании (осень 1998г.) гиперактивация метаболизма и иммунной системы выявлена в 35,7%, а снижение их активности - в 22,7% случаев.

Проспективные исследования, проведенные в 1996–2010 гг. выявили увеличение до 37,5% лиц с гипореактивностью и уменьшение до 12,5% группы с активацией метаболизма и повышением реактивности иммунной системы. В 32,5 % случаев у лиц с первоначальной значительной активацией в последующем наступало стойкое снижение реактивности систем иммунной и метаболической защиты, в 47,5% показатели вернулись в пределы нормальных величин, а в 22% случаев происходила длительная (более 24 мес) активация иммунной реактивности с развитием гиперреактивных состояний.

Проспективное наблюдение (1996-2010 гг.) за сотрудниками нефтеперерабатывающего предприятия в г. Кириши показало, что число здоровых уменьшилось до 16,8%, хронические заболевания выявлены в 73,2% случаев. Уровень патологической пораженности составил 1536 на 1000 чел.

Выявлено повышение распространенности заболеваний органов пищеварения и частоты затяжного течения язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки до 27,8% (в группе контроля – 13,9%). У большинства больных ЯБЖ и ЯБДК с затяжным течением была снижена активность дегидрогеназ лимфоцитов (СДГ, ЛДГ, ГАФДГ) и ГР, ГП, Г6ФДГ эритроцитов и выявляли отрицательные результаты активационных проб РТМЛ с ЛПС, у большей части больных с обычным течением ЯБЖ и ЯБДК были получены оппозитные результаты активационных проб с ЛПС и активности вышеуказанных ферментов (табл.13).

Таблица 13. Изменение иммунореактивности среди обследованных групп (здоровые и больные ЯБЖ и ЯБДК с обычным и затяжным течением)

Иммунореактивность	Здоровые n= 50	Затяжное течение ЯБЖ и ЯБДК (n=66)	Обычное течение ЯБЖ и ЯБДК (n=80)
Норма	44 (88%)	4 (7,1%)	12 (15%)
Гиперреактивность	2 (4%)	8 (14,2%)	63 (78,8%)*
Гипореактивность	4 (8%)	44 (78,7%)	5 (6,2%)*

Примечание: * - достоверные различия от группы с затяжным течением язвенной болезни желудка (P<0,01)

При проспективном наблюдении (1996-2010 гг.) установлено, что заболеваемость язвенной болезнью желудка у лиц с повышением метаболизма лейкоцитов и повышением иммунореактивности в 2,7 раза ($P > 0,01$) превышала аналогичную у лиц с нормальными показателями иммунной реактивности.

Установлено значительное увеличение частоты развития иммунной и метаболической гипореактивности при длительных экотоксических нагрузках и у больных с затяжным течением язвенной болезни. Это проявляется снижением активности дегидрогеназ лимфоцитов (СДГ, ЛДГ); ГР, Г6ФДГ эритроцитов, и отрицательными результатами активационных проб (РТМЛ с ЛПС).

У больных с обычным течением язвенной болезни результаты активационных проб с ЛПС и активности вышеуказанных ферментов были оппозитными в сравнении с группой с затяжным течением язвенной болезни. Сравнительный анализ течения язвенной болезни у пациентов, оппозитных по уровню иммунной реактивности свидетельствует о том, что у лиц с признаками гипореактивности затяжное течение язвенной болезни встречается в 1,8 раз чаще, чем в контрольной группе. Установлен сезонный характер развития иммунных нарушений, которые были наиболее выражены в осенний период.

Проспективные исследования свидетельствуют что отрицательные результаты активационных проб выявляются в основном у лиц с высокой экотоксической нагрузкой.

Установлено, что ПЛАДК и МЭХ способствовали восстановлению иммунной реактивности у сотрудников нефтеперерабатывающего предприятия (табл. 14).

Таблица 14 — Коррекция иммунных нарушений у сотрудников ООО «Киришинефтеорг-синтез» ($M \pm m$)

Исследуемые Параметры	Группа контроля n=52	Основная группа до лечения n=46	Применяемые средства	
			МЭХ n=20	ПЛАДК n =26
Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	6,25±0,79	5,43±0,84	5,48± 0,71	6,16±0,63
Лимфоциты $\times 10^9/\text{л}$	3,05±0,75	1,21±0,14*	2,39±0,19*	2,58±0,21*
РТМЛ с КоНА	94,2±7,8	144,2±11,3*	70,7±7,3*	62,6±6,9*
РТМЛ с ЛПС	82,7±9,3	133,7± 10,9*	69,4±7,1*	60,3±6,5*
РТМЛ с Г-КСФ	87,5±9,1	129,5±10,7*	63,3±8,4*	76,5±7,8*

Примечание: * - достоверные различия с группой контроля ($P < 0,05$)

Достоверно увеличилось общее количество лимфоцитов; отмечается активация показателей клеточного иммунитета (по данным РТМЛ). Следовательно, экзогенные БТШ70 (ПЛАДК) и их индукторы (МЭХ) препятствовали развитию иммунной гипореактивности при длительном воздействии химических загрязнителей на организм человека

Результаты проспективных исследований свидетельствуют о том, что при длительном стаже работы на нефтеперерабатывающем предприятии (более 15 лет) развивается синдром иммунной гипореактивности, который также характерен для затяжных формах течения язвенной болезни. Поэтому для лечения этих патологических состояний могут быть использованы средства однонаправленного действия.

При местном лечении торпидно текущих язв желудка использовали облучение перилуцерозной зоны лучами лазера на парах меди. Рубцевание язвенного дефекта через 28 сут после начала лазерной терапии в основной группе наступило в 27 из 29 случаев (93,1%), а в группе контроля – в 16 из 27 случаев (59,3%), $P < 0,05$.

Облучение периульцерозной зоны лучами лазера с активными средами на парах меди ускорило рубцевание торпидно текущих язв желудка и значительно (в $5,6 \pm 1,2$ раза) повышало уровень БТШ70 в СОЖ периульцерозной зоны.

Полученные результаты указывают на роль индукции БТШ70 в СОЖ в механизме противоязвенного действия излучения лазера на парах меди при местном лечении длительно не рубцующихся язв желудка

Таблица 15. Влияние облучения лазером на парах меди периульцерозной зоны на иммунные и метаболические показатели у больных с затяжным течением язвенной болезни желудка

Показатели	А, n=56	В, n=29	С, n=27
ГР	0,09±0,01	0,22± 0,03*	0,12±0,02
Г6ФДГ	0,32±0,01	0,71±0,06*	0,37±0,03
ЛДГ	7,8±0,6*	25,5±0,9*	11,3±0,6
СДГ	10,8±0,7*	19,3±1,2*	12,8±0,9
РТМЛ с КонА	132,3±11,2	72,4±8,3*	131,6±11,9
РТМЛ с ЛПС	129,3±10,5	68,5±7,9*	127,7±10,6
РТМЛ с Г-КСФ	121,5±10,7	61,7±7,3*	121,4±10,1

Примечания: * – достоверные различия в сравнении с группой контроля ($P > 0,05$); Пациенты с торпидным течением ЯБЖ: А – до лечения; В – после лечения (лазерная терапия); С – после лечения группа контроля (обычная терапия)

Полученные данные также свидетельствуют о том, что лазерная терапия способствует восстановлению иммунной реактивности (по данным РТМЛ) и показателей активности дегидрогеназ лимфоцитов и ферментов энергетического обмена, которые снижены у больных с затяжным течением язвенной болезни желудка (табл.18)

Индукторы БТШ70 являются эффективными средствами коррекции синдрома иммунной гипореактивности при длительных экотоксических нагрузках и у больных с затяжным течением язвенной болезни желудка.

Заключение

Получены средства перекрестной защиты организма при экстремальных воздействиях с использованием лазерных, радиационных и биологических технологий.

Лазерное излучение применяли для активации дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae* и клеток кожи, что сопровождалось мобилизацией эндогенных БТШ70.

Модификацию бактериальных ЛПС, полисахаридов из морской травы Зостеры, вируса гриппа (H3N2) и парамиксовируса Сендай осуществляли путем их обработки широкоапертурным пучком электронов.

Биологические технологии использовали для получения рекомбинантных БТШ70 и их производных пролонгированного действия – БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc.

Дополнительным молекулярным механизмом повышения эффективности перекрестной защиты от биопатогенов при применении гибридного белка БТШ70-Fc может быть взаимодействие Fc фрагмента IgG с Fc-рецепторами клеток-эффекторов иммунной системы [Yang S. et al., 2018].

Результаты исследования подтверждены данными M.V. Galaternik et al. (2016), L. Gang et al. (2018) об активации лазерным излучением синтеза эндогенных БТШ70, применении γ -лучей для получения биологически активных олигосахаридов [Jalan N. et al., 2013], нетоксичных производных бактериальных ЛПС [Bertok L., 2005], повышения иммуногенности гриппозной и ротавирусной вакцин [David S.C. et al. 2017; Shadrudin S. et al, 2018].

В ответ на экстремальные воздействия развивается клеточный стресс и системное воспаление, которое характеризуется сменой фаз активации и торможения: гиперэргическая провоспалительная фаза (сверхактивация иммунной системы) переходит в гипоэргическую - состояние иммуносупрессии, анергии, «иммунный паралич» [Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., 2014, Gusev E.Y., Zotova N.V., 2019].

Стратегия лечения при системном воспалении направлена на сохранение баланса разнонаправленных систем воспалительного и компенсаторного противовоспалительного иммунного ответа. Сверхактивация воспалительных реакций с развитием «цитокиновой бури» является основой для назначения ингибиторов, а развитие иммуносупрессии – стимуляторов иммунного ответа или заместительной терапии.

Сверхактивацию воспалительных реакций при сепсисе предотвращает блокада TLR4 рецепторов, которая повышает толерантность к бактериальному эндотоксину и позволяет значительно уменьшить летальность при эндотоксическом шоке, [Liu D. et al. , 2019; Manago A., et al., 2019].

Выход фосфатидилсерина на наружную поверхность клеточной мембраны играет важную роль в развитии клеточного стресса, системного воспаления и септического шока. Блокаторы фосфатидилсерина препятствуют развитию этих изменений [Beattie G. et al., 2019]. Основанием для применения БТШ70 в качестве блокатора фосфатидилсерина при септическом шоке может быть его специфическое взаимодействие с фосфатидилсерином на наружной поверхности клеточной мембраны [Bilog A.D., 2019].

Гиперэкспрессия «тормозных» PD-1 рецепторов лимфоцитов при септическом шоке указывает на высокий риск летального исхода [Tomino A. et al., 2017]. Блокаторы «тормозных» рецепторов лимфоцитов препятствуют иммуносупрессии при остром системном воспалении [He X. et al., 2018; Watanabe E. et al., 2018]. Агонисты TLR4 рецепторов (производные бактериальных ЛПС) подавляют экспрессию PD-1 рецепторов и повышают эффективность применения их блокаторов [Zahm C.D. et al., 2018; Flowers C. et al., 2018].

Блокаторы PD-1 рецепторов предотвращают «иммунный паралич» и повышают выживаемость животных при септическом шоке [Zhang Q. et al., 2018; Nedeva C. et al, 2019].

Защитный эффект наиболее выражен при «двойной блокаде» PD-1 и Tim-3 рецепторов [Xia Q. et al., 2018].

Установлено, что БТШ70 является «двойным блокатором» PD-1 и Tim-3 «тормозных» рецепторов T-лимфоцитов [Оникиенко С.Б. и соавт, 2016].

Результаты исследования свидетельствуют о том, что БТШ70 и мЛПС защищают экспериментальных животных от эндотоксического шока.

Данные, полученные на модели эндотоксического шока у генетически модифицированных мышей без TLR4 (линия СЗН/HeJ) подтверждают представление о том, что механизм защитного действия мЛПС и БТШ70 может быть связан с блокадой TLR4 рецепторов. Это подтверждают результаты исследований на модели сепсиса у генетически модифицированных мышей без TLR4 рецепторов [Cao C. et al. , 2018]

Подтверждена связь защитного эффекта БТШ70 от биопатогенов с блокадой TLR4 [Антонова О.Ю, 2013; Zeng H. et al., 2018].

Выявлено, что блокаторы TLR4 [Винокуров М. Г. и соавт., 2009; Маркин А.А., 2013; Kuzmich et al. 2017; Patel M.C. et al. , 2018] и экзогенный БТШ70 [Махлай А.А. и соавт., 2011; Кустанова Г.А.И, 2006; Ebrahimi S.M. et al., 2012] защищают экспериментальных животных от сепсиса и летальных вирусных инфекций.

При сочетании БТШ70 с ЛПС его защитный эффект усиливается [Егорова Н.Б. и соавт, 2009]. Рекомбинантная конструкция БТШ70-ЛПС защищает мышей от инфекции, вызываемой *Salmonella Typhi murium* [Воробьев Д.С., Семенова И.Б. , 2009].

Механизм защитного действия мЛПС и экзогенного БТШ70 при экспериментальном эндотоксическом шоке у мышей включает подавление патологического синдрома клеточного

стресса и системного воспаления и может быть связан с воздействием на TLR4 и блокадой «тормозных» рецепторов лимфоцитов.

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) — это локализованный ответ на системное воспаление [Зординова К.А. и др., 2017]. В патогенезе ОРДС важную играют механизмы вышедшей из под контроля системной воспалительной реакции на инфекцию, токсическое воздействие или травму. Высокая летальность при ОРДС (60-80%) коррелирует с повышением уровня воспалительных цитокинов IL-6 и HMGB1 (амфотерина) [Росстальная А.Л. и др., 2016; Li W. et al., 2019]. Параллельно с активацией каскада провоспалительных цитокинов запускаются и противовоспалительные механизмы — IL-10, α 2-макроглобулин, антагонисты рецепторов TNF и IL-1 [Пугач В.А. и др., 2019; Qui L. et al., 2019]. Блокада системного воспаления способствует снижению летальности и препятствует развитию ОРДС [Meduri G.U. et al., 2009].

При ингаляционном поражении фосгеном и высокопатогенном гриппе у мышей выявлено значительное повышение числа Т-лимфоцитов с «тормозными» PD-1 и Tim-3 рецепторами и резким снижением в них уровня гранзима В, что отражает развитие иммунной гипореактивности и анергии («иммунный паралич»).

Защитный эффект БТШ70 связан с блокадой «тормозных» PD-1 и Tim-3 рецепторов CD8+ Т-лимфоцитов. Это подтверждают данные G.Li et al. (2019) о защитном эффекте блокаторов Tim-3 рецепторов при высокопатогенном гриппе H1N1. Восстановление уровня гранзима В в лимфоцитах при воздействии БТШ70 коррелирует со снижением числа PD-1 и Tim-3-позитивных CD8+ Т-лимфоцитов.

Молекулярные механизмы защитного действия БТШ70, БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc при ОРДС включают нейтрализацию воспалительного цитокина HMGB1, ликвидацию выраженного дисбаланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IL-6/IL-10). Наиболее эффективным было применение БТШ70-Fc.

Это может быть обусловлено блокадой Fc-рецепторов, которые повышают экспрессию «тормозных» Tim-3 рецепторов клеток-эффекторов иммунной системы [So E.C. et al., 2019]. Полученные результаты согласуются с данными A. Borchardt et al. (2019) о подавлении развития ОРДС при высокопатогенном гриппе у мышей при применении препаратов, конъюгированных с Fc-фрагментом IgG1.

Результаты исследования подтверждены работами, которые свидетельствуют о том, что повышение уровня HMGB1 [Patel M.C. et al., 2018] и гиперэкспрессия PD-1 рецепторов Т-лимфоцитов [Lomas-Neira J. et al., 2018] являются маркерами неблагоприятного прогноза ОРДС, а повышение уровня БТШ70, наоборот, предотвращает его развитие [Li X. et al., 2018; Zeng H. et al., 2018].

Защитный эффект применения БТШ70 при токсическом отеке легких подтверждают результаты, полученные на модели ингаляционного отравления фосгеном [Parseghian M.H. et al., 2016; Hobson S.T. et al., 2019].

Эффективность противовирусной защиты при летальной гриппозной инфекции у мышей, вызываемой вирусом H3N2 достоверно повышается при комбинированном применении модифицированных пучком электронов вакцины «Ваксигрипп» и парамиксовируса Сендай (штамм «Москва») за 14 сут до заражения.

Модифицированные пучком электронов вирус гриппа (H3N2) и парамиксовирус Сендай вызывают перекрестный иммунный ответ на разные штаммы вируса гриппа, что может сэкономить средства на разработку новых сезонных противогриппозных вакцин.

Полученные результаты подтверждают данные литературы о развитии перекрестного иммунного ответа на разные штаммы вируса гриппа и повышении иммуногенности противогриппозной вакцины при ее гамма-облучении [David S.C et al., 2017].

Феномен интерференции вирусов используют для защиты от высокопатогенных вирусов путем введения животным непатогенных «лечебных» вирусов [Paff M.L. et al. 2016].

Это ключевой механизм защиты от высокопатогенной гриппозной инфекции, вызываемой штаммами H1N1 и H5N1, парамиксовирусами (парагриппа, вируса болезни Ньюкасла) [Costa-Hurtado M. et al., 2015; Mooney A.J. et al., 2017].

Перекрестный защитный эффект непатогенного для человека вируса парагриппа мышей (вируса Сендай) от высокопатогенных вирусов гриппа, парагриппа, метапневмовируса и респираторно-синцитиального вируса может быть связан с тем, что он является мощным индуктором интерферона [Zhang Q. et al., 2011; Russel C.J., 2016].

Вирус Сендай используют для получения лекарственного препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный» [Волкова Л.В., 2004].

Секретия интерферона Т-лимфоцитами активирует перекрестную защиту от разных штаммов вируса гриппа (H1N1 и H3N2) [Gooch K.E. et al., 2019]. Т-лимфоциты запускают механизмы перекрестной защиты от разных штаммов вируса гриппа [Koutsakos M. et al., 2019] и других биопатогенов [Monette A., Mouland A.J., 2019].

Выявление свойств «перекрестной защиты» у вируса парагриппа Сендай указывает на возможность получения на его основе средств защиты от террористических атак с использованием таких биопатогенов как новый высокопатогенный вирус парагриппа «Clade X», который по прогнозу Центра Безопасности Здравоохранения при университете Джона Хопкинса (США) может заразить 900 млн человек, 150 млн из них погибнет [Alexopoulos N., 2018]. Выявление нового высокопатогенного вируса гриппа, который способен вызвать летальное поражение у 80 млн человек диктует необходимость разработки средств перекрестной защиты от разных штаммов вируса гриппа [Brundtland G.H et al., 2019]. Модификация вирусов гриппа и парагриппа пучком электронов может быть одним из путей решения этой задачи.

Известно, что БТШ70 активирует реакции перекрестной защиты от разных биопатогенов [Chitradevi S.T. et al., 2013]. Индукция эндогенных БТШ70 при введении вакцины БЦЖ вызывает эти реакции перекрестной защиты [Mano R. et al., 2018 ; Butkeviciute E. et al., 2018].

Результаты исследования свидетельствуют о том, что лазерная мобилизация эндогенных БТШ70 клетками кожи и внутрикожное введение экзогенных БТШ70 в зону вакцинации повышают эффективность противогриппозной вакцины. Адьювантный эффект получен при сочетании лазерного облучения кожи с введением вакцины «Ваксигрип» в зону облучения, а также при комбинации вакцинации с внутрикожным введением мЛПС и экзогенного БТШ70. Выявлена зависимость адьювантного эффекта лазерного излучения от его экспозиционной дозы. Повышение эффективности вакцинации при лазерном облучении кожи в области введения противогриппозной вакцины связано с мобилизацией эндогенных БТШ70, которые обладают свойствами адьювантов вакцин. Это сопровождается миграцией и активацией антигенпредставляющих дендритных клеток в зону лазерного облучения кожи, что обеспечивает повышение иммуногенности вакцины при ее введении в зону облучения. Полученные результаты подтверждают данные литературы о повышении эффективности вакцин при их применении в комбинации с индуктором БТШ70 эхинохромом и рекомбинантным БТШ70 [Цибульский А.В. и соавт. , 2012 ; Buriani G. et al., 2012].

Использование адьювантных свойств лазерного излучения снижает потребность в проведении повторных вакцинаций, а также значительно уменьшает дозу антигена, которая была бы достаточной для развития целевого иммунного ответа. Недостатками существующих адьювантов вакцин являются их высокая реактогенность, токсичность и возможность развития системных побочных реакций. Основным адьювантом, разрешенным для клинического применения, является гидроокись алюминия, который активирует только гуморальное звено иммунного ответа, но не влияет на клеточный иммунитет. В качестве адьювантов клеточного иммунного ответа можно использовать цитокины, но их применение ограничено высокой стоимостью препаратов. Технология лазерных адьювантов вакцин, способна значительно усилить целевой иммунный ответ. Локальное воздействие лазера на

поверхность кожи не приводит к развитию системных побочных реакций, которые характерны для существующих адъювантов.

Апробацию результатов исследования проводили в Центре Вакцин и Иммунотерапии и Центре Фотомедицины Главного Госпиталя штата Массачусетс и в отделе дерматологии Гарвардской Медицинской Школы (Бостон, США). Подтверждено, что лазерное излучение значительно повышает иммуногенность противогриппозной вакцины, что позволяет существенно (более чем в 50 раз) снизить дозу вакцины, необходимую для осуществления эффективной вакцинации [Chen X., Wu M.X., 2011; Kashiwagi S. et al., 2013]. Также были подтверждены результаты исследования, которые выявили роль мобилизации и активации дендритных клеток кожи в реализации адъювантного эффекта лазерного излучения при внутрикожной вакцинации [Morse K. et al., 2017 ; Lopes P.P. et al., 2018].

Пилотное клиническое исследование показало, что лазерное облучение кожи вызывает мобилизацию дендритных клеток в зону облучения и вакцинации, которые «захватывают» целевые антигены противогриппозной вакцины и доставляют их в дренирующие лимфатические узлы, что повышает эффективность вакцинации [Gelfand J.A. et al., 2019]. Комбинированное применение излучения лазера и блокаторов «тормозных» PD-1 рецепторов лимфоцитов приводит к взаимному усилению целевого иммунного ответа [Luo L. et al. , 2018]. Разработаны портативные лазерные устройства для повышения эффективности вакцинации [Bean D. et al., 2019]. Обработка кожи в зоне вакцинации электромагнитным излучением в радиочастотном диапазоне (0,3-10 МГц) также вызывает мобилизацию эндогенного БТШ70 и повышает эффективность противогриппозной вакцины H1N1 [Cao Y. et al., 2018].

При геморрагическом шоке острая гипоксия вызывает поражения органов-мишеней (печени, почек, легких) и является пусковым механизмом развития патологических синдромов клеточного стресса и системного воспаления [Ремизова М.И. и др. , 2010; Бражников А. Ю. 2015]. Повышение устойчивости к гипоксии при введении животных в состояние гипобииза обеспечивает их выживание при летальной массивной кровопотере [Самойлов А.С. и др., 2017]. Использование для этого газовых и жидких смесей на основе газа ксенона позволяет в 3 раза повысить выживаемость при 50% кровопотере [Бирюков С.В. и др., 2018; Петров В.А. и др., 2019]. При геморрагическом шоке установлен защитный эффект антигипоксантов этомерзола и олифена [Удовиченко В.И. и др., 1991; Кочетыгов Н. И., 1993].

Индукторы БТШ70 [Еляков Г.Б. и др., 1999 ; Агафонова И.Г. и др., 2017; Лазарев В.Ф. и др. 2019; Mao I. et al., 2018; Luo L. et al., 2019; Shao A. et al., 2019] и экзогенный БТШ70 [Onikienko S.V. et al., 2013] обладают свойствами антигипоксантов и существенно уменьшают зону поражения при экспериментальном инфаркте миокарда, инсульте и травматических поражениях головного мозга. Это является патофизиологическим обоснованием применения БТШ70 при геморрагическом шоке. Он также связывает фосфатидилсерин на наружной поверхности клеточной мембраны, что позволяет использовать его в качестве блокатора фосфатидилсерина [Bilog A.D., 2019]. Блокаторы фосфатидилсерина препятствуют развитию поражений органов-мишеней при геморрагическом шоке, которые обусловлены выходом фосфатидилсерина на наружную поверхность клеточной мембраны в ответ на клеточный стресс [Cohan C. et al. , 2019].

Травматический токсикоз является частным проявлением синдрома «ишемии-реперфузии», который характеризуется признаками системного воспаления с развитием полиорганной недостаточности в фазе иммунной гипореактивности и анергии и экспонированием фосфатидилхолина на наружной поверхности эндотелия сосудов [Даглатова А.А., 2016; Саидов М.З. и др., 2017 ; Strumwasser A. et al., 2018]. Следовательно, антигипоксанты и блокаторы фосфатидилсерина можно применять для предотвращения развития синдрома

длительного сдавления. Установлен защитный эффект антигипоксантов при травматическом токсикозе у экспериментальных животных [Зарубина И.В., 2012]. Наличие у БТШ70 свойств антигипоксанта и блокатора фосфатидилсерина может быть патофизиологическим обоснованием его применения при травматическом токсикозе.

Установлено, что БТШ70 и его производные пролонгированного действия значительно повышают выживаемость крыс при острой массивной кровопотере и травматическом токсикозе. Они препятствуют развитию системной иммунной воспалительной реакции, снижают соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-6/ИЛ), а также защищают органы-мишени (сердце, печень, почки) от поражений и препятствуют развитию рабдомиолиза.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что БТШ70 значительно повышает продолжительность жизни при геморрагическом шоке (в 3,4–5,1 раза). Защитный эффект БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc более выражен в сравнении с БТШ70. Пациенты с массивной кровопотерей часто погибают из-за невозможности своевременного оказания им специализированной медицинской помощи. Сформулированная в работе стратегия увеличения продолжительности жизни при геморрагическом шоке расширяет границы так называемого «золотого часа» и позволяет доставить раненых и пострадавших в специализированные медицинские учреждения и спасти им жизнь.

Полученные результаты согласуются с данными о роли БТШ-зависимых реакций и активации TLR4-рецепторов в развитии почечной и полиорганной недостаточности при геморрагическом шоке и рабдомиолизе [McGhan L.G., 2012; Horst K. et al, 2016; Li J. et al. 2019]. Они свидетельствуют о том, что БТШ70 повышает устойчивость организма к кровопотере и компрессионной травме, предотвращает развитие геморрагического шока и травматического токсикоза. Известно, что развитие иммуносупрессии при механической травме связано с гиперэкспрессией «тормозных» PD-1 рецепторов [Ruhrmann S. et al., 2019]. Вероятно, блокада этих рецепторов является одним из механизмов защитного действия БТШ70 при компрессионной механической травме.

Клеточный стресс и системное воспаление играют важную роль в патогенезе радиационных поражений [Ezz M.K. et al, 2018; Kim W. et al., 2019]. С этих позиций представляется перспективным применение в качестве радиопротекторов защитных белков клеточного стресса (БТШ70) и блокаторов рецепторов врожденного иммунитета (TLR4 и TLR5) для подавления системных иммунных воспалительных реакций [Kim J.Y. et al. , 2019], в том числе радиомодифицированного бактериального ЛПС (мЛПС).

Применение мЛПС, БТШ70, БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc после общего γ -облучения в дозе 10 Гр значительно повышало выживаемость экспериментальных животных. мЛПС и БТШ70 препятствовали развитию лейкопении после облучения в дозе 6,5 Гр. Максимальный защитный эффект выявлен при сочетанном применении БТШ70 и мЛПС. БТШ70 предотвращал развитие нарушений клеточного иммунитета при сублетальном общем гамма-облучении. БТШ70 и мЛПС препятствовали снижению массы селезенки после общего γ -облучения в дозе 6,5 Гр.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что БТШ70, БТШ70-ПЭГ, БТШ70-Fc и мЛПС препятствуют развитию миелосупрессии и иммунных нарушений, а также повышают выживаемость подопытных животных после общего γ -облучения. Цитопротективный эффект усиливается при сочетанном применении мЛПС и БТШ70. Это подтверждают данные о радиопротективных свойствах производных бактериальных ЛПС - агонистов TLR4 [Liu Z. et al. 2018] и TLR5 – флагеллина [Toshkov I.A. et al, 2017; Kim J.Y. et al, 2019]. Общее γ -облучение повышает экспрессию «тормозных» PD-1 рецепторов лимфоцитов, что приводит к иммуносупрессии [Guida M.C. et al, 2016]. Блокада этих рецепторов может быть

одним из механизмов защитного действия БТШ70 при общем γ -облучении. Индукторы БТШ70 также обладают свойствами радиопротекторов [Kim J.S. et al., 2016].

Результаты исследования свидетельствуют о том, что продукты лазерной стресс-активации клеток ксеногенных по отношению к защищаемому организмов – пищевых дрожжей (ПЛАДК) протезируют нарушенные механизмы защиты от экстремальных патогенных воздействий. Импульсное воздействие излучения лазера на дрожжевую культуру *Saccharomyces cerevisiae* активизирует синтез и мобилизацию эндогенных БТШ70, которые защищают экспериментальных животных от радиационных поражений.

ПЛАДК *Saccharomyces cerevisiae* повышает выживаемость, препятствует развитию метаболических нарушений, вызываемых сублетальным общим γ -облучением у мышей, восстанавливает активность клеточного звена иммунитета и подавляет избыточную активацию перекисных процессов.

На основании полученных результатов предложена концепция стресс-ксенобиотерапии – применение продуктов стресс-активации ксеногенных по отношению к защищаемому организмов импульсными воздействиями физических факторов высокой интенсивности. Это соответствует данным о защите организма человека от поражений при экстремальных воздействиях активированной сывороткой, полученной из крови животных и птиц после дозированного воздействия на них факторов стресса высокой интенсивности (электростимуляция, сдавливание мягких тканей, «высотная гипоксия») [Шестаков В.А., 2013; Leschinsky В., 2018]. «Высотная гипоксия» является мощным индуктором эндогенного БТШ70 у экспериментальных животных [Li W.H. et al., 2019].

В патогенезе декомпрессионной болезни ключевую роль играют острая декомпрессионная гипоксия, а также реакции клеточного стресса и системного воспаления, которые, обусловлены повреждением клеток эндотелия сосудов при внутрисосудистом газообразовании [Quing L. et al., 2018]. Для подавления этих реакций применяют антигипоксанты и стресс-протекторы. Патогенетически обосновано применение гипербарической оксигенации, которая предотвращает развитие декомпрессионной гипоксии и запускает синтез эндогенных защитных белков стресса – БТШ70 [Wu Н.Н. et al., 2018]. Инертный газ ксенон также является индуктором БТШ70 и повышает резистентность организма к гипоксии при экстремальных глубоководных погружениях [Захарова Н.М. и др., 2019; Zhao H. et al., 2013]. Стресс-протектор «Эскин» (экстракт Каштана конского «Fructus aesculini hippocastani») предотвращает повреждение клеток эндотелия, подавляет патологические реакции клеточного стресса и, системного воспаления, снижает уровень воспалительных цитокинов HMGB1, IL-6, TNF- α , IL-1 β и предотвращает развитие декомпрессионной болезни при глубоководных погружениях [Cheng Y. et al., 2015; Zhang K. et al., 2017, Chen C. et al., 2019].

Результаты исследования свидетельствуют о том, что отсутствие повышения БТШ70 или его снижение при барокамерном моделировании экстремальных глубоководных погружениях является проявлением дезадаптации и основанием для применения экзогенных защитных белков стресса – БТШ70 (БТШ70-ПЭГ, БТШ70-Fc) для профилактики и лечения декомпрессионной болезни. Эти препараты препятствуют развитию декомпрессионной болезни при моделировании глубоководных погружений у экспериментальных животных.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что БТШ70 и его производные являются актопротекторами. Они значительно (в 2-3 раза) повышают выносливость и физическую работоспособность при интенсивных истощающих физических нагрузках. БТШ70 восстанавливает целостность мембран миоцитов, увеличивает плотность их капиллярной сети и способствует репарации мышц за счет активации их сателлитных стволовых клеток, снижает уровень провоспалительного цитокина ИЛ6 при сохранении повышенного содержания в крови противовоспалительного цитокина ИЛ10.

БТШ70 подавляет асептическое воспаление, рабдомиолиз и дистрофию мышц, стимулирует ангионеогенез и репаративные процессы при повреждении миоцитов. Известно, что провоспалительные цитокины играют важную роль в развитии повреждений клеточных мембран миоцитов при экстремальных физических нагрузках [Theophilidis G. et al., 2018]. Это коррелирует с повышением уровня нейтрофилов и лимфоцитов в крови, однако при повышении интенсивности и продолжительности нагрузок количество лимфоцитов достоверно снижается, значительно повышается число лимфоцитов с «тормозными» PD-1 рецепторами что обуславливает развитие иммуносупрессии [Gustafson M.P., 2017; Fortunato A.K. et al. 2018].

Другим механизмом развития иммуносупрессии при экстремальных физических нагрузках может быть развитие синдрома стрессорного иммунодефицита потребления, феномена «исчезающих антител», который связан с блокадой Fc рецепторов активированных лейкоцитов сывороточными антителами (их Fc-фрагментами), который зарегистрирован в качестве научного открытия [Суздальницкий Р.С. и др. , 1977].

Возможным механизмом защитного действия БТШ70 при экстремальных физических нагрузках является блокада «тормозных» PD-1 рецепторов Т-лимфоцитов, повышение эффективности БТШ70-Fc связана с тем, что он дополнительно блокирует Fc-рецепторы клеток-эффекторов иммунной системы.

Полученные результаты согласуются с данными о снижении физической работоспособности при дефиците эндогенного БТШ70, который защищает мышцы от экстремальных стрессорных воздействий, повышает эффективность процессов регенерации и репарации мышц [Senf S.M. et al., 2013; Apostulopulos A. et al., 2018; Kruger K. et al., 2019].

Показана перспективность применения БТШ и их индукторов для лечения мышечных дистрофий [Thakur S.S. et al., 2018].

Выбор стратегии адаптации, направленность и выраженность иммунного и метаболического ответов на воздействие экотоксикантов веществ зависит от их концентрации и продолжительности воздействия на организм. Длительное воздействие малых доз ксенобиотиков вызывает продолжительную реакцию клеточного стресса, активацию систем иммунной и метаболической защиты. Их недостаточная активация свидетельствует о снижении адаптационного потенциала клеток, а гиперактивация вызывает развитие синдромов сверхкомпенсации. Электрофильные ксенобиотики первоначально активируют ферменты энергетического обмена (СДГ и ЛДГ), во второй фазе интоксикации их активность значительно снижается. Увеличение длительности интоксикации уменьшает способность лейкоцитов реагировать на активаторы. Результаты проспективных исследований свидетельствуют о том, что повышение ответа лейкоцитов на активаторы (индукция секреции цитокинов и БТШ70) может быть критерием эффективности лечения синдромов гипореактивности.

Оценка изменений активности ферментов микросомального окисления (проба с фенобарбиталом) и «кислородного взрыва» в первой фазе интоксикации показала, что малые дозы электрофильных ксенобиотиков повышают способность организма к окислению токсических молекул. Во второй фазе интоксикации активность системы биологического окисления значительно снижается, что свидетельствует о развитии дезадаптации.

Электрофильные ксенобиотики вызывают двухфазные изменения клеточного иммунитета. Первоначальное торможение миграционной активности лейкоцитов (РТМЛ) в ответ на ЛПС сменяется на ее ускорение при увеличении концентрации и времени действия токсикантов. Повышение стимулированной секреции БТШ70 сменяется на снижение или отсутствие ответа на стимуляцию. Двухфазный характер реакций клеточного стресса при хронической интоксикации определяет стратегии разработки средств защиты от поражений при воздействии токсических веществ. В первой стадии интоксикации, которая характеризуется активацией иммунных и метаболических реакций клеточного стресса применяют мЛПС, который препятствует избыточной активации этих реакций. Во второй стадии

используют продукт лазерной активации дрожжевой культуры (ПЛАДК) и масляный экстракт хмеля (МЭХ), которые препятствуют развитию иммунной и метаболической гипореактивности. Наибольший защитный эффект установлен у ПЛАДК. Стресс-ксенобиотерапия с мобилизацией эндогенного БТШ70 у ксеногенных по отношению к защищаемому организмов препятствует развитию иммунных и метаболических нарушений при экспериментальном экотоксическом стрессе у мышей.

Активация ферментов восстановительного обмена в первой фазе интоксикации - это реакция адаптации, которая защищает клетки от токсического действия высоких доз электрофильных ксенобиотиков. Критерием адаптации является постепенное уменьшение реакции «клеточного стресса», а ее срыва – преждевременное торможение этих реакций, развитие гипореактивности и гипозергии. Недостаточная выраженность реакций «клеточного стресса» требует дополнительной активации ферментов восстановительного обмена, активации секреции цитокинов и БТШ70, а при дальнейшем снижении метаболического обеспечения функций клетки – назначения заместительной терапии. Повышение уровня БТШ70 при экотоксических воздействиях представляет собой реакцию адаптации [Rhee J.S et al. 2009; Morales M. et al., 2011].

Ответная реакция организма на токсические воздействия включает три стадии: стресс-активацию, развитие толерантности к воздействию химических загрязнителей и срыв адаптации, развитие гипореактивности и гипозергии. Выявление стадии и характера ответной реакции организма определяет стратегию лечения, которая должна соответствовать этой стадии.

Разнонаправленность реакции адаптации организма в различные стадии интоксикации диктует необходимость их ранней диагностики для оптимизации лечения – предотвращение избыточной активации систем иммунной и метаболической защиты в первой фазе; преодоление толерантности клеток к регуляторным воздействиям или проведение заместительной терапии во второй фазе интоксикации.

Одним из путей решения этой задачи является повышение уровня эндогенных защитных внеклеточных БТШ70 в первой фазе и применение экзогенных БТШ70 при отрицательных результатах активационных проб во второй фазе хронической интоксикации.

«Гистохром», производное гидроксинафтохинона обладает свойствами индуктора БТШ70 [Еременко Е.М. и соавт., 2010]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что он активирует антиэлектрофильный ответ и секрецию БТШ70. Масляный экстракт хмеля обладает аналогичными свойствами.

Разработана тактика лечения иммунных и метаболических нарушений при экстремальных и экотоксических воздействиях на основе использования активационных проб – стресс-активации (мобилизации) эндогенных БТШ70 (гипоксическая проба); активационные пробы с ЛПС (РТМЛ, секреция цитокинов).

Значительное повышение заболеваемости болезнями органов пищеварения у работников нефтеперерабатывающего предприятия может быть связано с экотоксическими воздействиями. Оно коррелирует с периодами повышения концентрации ксенобиотиков в питьевой воде в сравнении с среднемноголетними значениями. При увеличении продолжительности экотоксических воздействий уровень БТШ70 в крови снижается.

Ингаляционные пробы с гипоксией выявили снижение способности организма к секреции БТШ70 в кровь у лиц с длительной и высокой инкорпорацией экотоксикантов.

Особенностями хронических болезней при экотоксических воздействиях являются частые обострения, затяжное и рецидивирующее течение, развитие иммунометаболических нарушений. Выявлен двухфазный характер изменений в системе иммунного надзора организма, который зависит от стажа работы на нефтехимическом предприятии.

Первоначальная активация иммунного ответа часто (32,5%) переходит в его торможение. Отрицательные результаты активационных проб выявляют в основном у лиц с

высокой экотоксической нагрузкой и свидетельствуют о развитии иммунной гипореактивности. Она также развивается при затяжных формах течения язвенной болезни.

Для лечения этих синдромно-сходных патологических состояний могут быть использованы средства однонаправленного действия.

Продукт лазерной активации дрожжевой культуры (ПЛАДК) и масляный экстракт хмеля (МЭХ) способствуют восстановлению реактивности иммунной системы у сотрудников нефтеперерабатывающего предприятия.

При затяжном течении язвенной болезни значительно повышается частота развития гипореактивности иммунной системы и снижения метаболического ответа на различные раздражители.

Полученные результаты свидетельствуют о связи противоязвенного эффекта лазерного облучения периульцерозной зоны с индукцией эндогенных БТШ70 и восстановлением показателей реактивности иммунной системы. Их подтверждают исследования L.Gang et al. (2019) и данные литературы о роли БТШ70 и их индукторов в заживлении язвенного дефекта [Choi S.R et al., 2009; Luiz-Ferreira A. et al., 2011; Ishihara T. et al., 2011].

Результаты исследования свидетельствуют о том, что рекомбинантные БТШ70, их производные пролонгированного действия, а также продукты физической модификации биообъектов являются перспективными средствами перекрестной защиты от экстремальных воздействий. Использование лазерных технологий позволяет значительно повысить эффективность вакцинации для защиты от биопатогенов.

ВЫВОДЫ

1. Патофизиологической основой применения защитных белков клеточного стресса – БТШ70 для лечения эндотоксического шока, высокопатогенной гриппозной инфекции, отравлений фосгеном, циклофосфаном и при общем γ -облучении у мышей является блокада механизмов развития клеточного стресса и его системных проявлений
2. Введение радиомодифицированного бактериального ЛПС защищает экспериментальных животных при эндотоксическом шоке, высокопатогенной гриппозной инфекции, отравлениях фосгеном и циклофосфаном, общем γ -облучении путем повышения толерантности к бактериальному эндотоксину, который активизирует системное воспаление и клеточный стресс.
3. Эффективность применения производных БТШ70 (БТШ70-ПЭГ, БТШ70-Fc) для перекрестной защиты от биопатогенов, токсических и радиационных поражений превышает результаты, полученные при использовании немодифицированного БТШ70. Максимальный эффект получен при комбинированном введении БТШ70 и радиомодифицированного бактериального ЛПС.
4. Механизм защитного действия БТШ70 при высокопатогенной гриппозной инфекции и ингаляционном отравлении фосгеном у мышей включает восстановление баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, нейтрализацию воспалительного цитокина амфотерина и блокаду «тормозных» рецепторов Т-лимфоцитов.
5. Лазерное облучение кожи в зоне вакцинации повышает эффективность противогриппозной вакцины «Ваксигрип» за счет мобилизации эндогенного БТШ70.
6. Модифицированные пучком электронов парамиксовирус Сендай и вакцина «Ваксигрип» активизируют механизмы перекрестной защиты от вирусов гриппа H1N1 и H3N2
7. Введение БТШ70 и его производных (БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc) повышают устойчивость экспериментальных животных к компрессионной травме и острой массивной кровопотере, препятствуют развитию декомпрессионной болезни при барокамерном моделировании глубоководных погружений.

8. Применение БТШ70 и его производных (БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc) повышает выносливость и физическую работоспособность при истощающих физических нагрузках. Это обусловлено снижением уровня провоспалительных цитокинов, повышением плотности капиллярной сети, активацией репарации поврежденных мышц в результате стимуляции их стволовых сателлитных клеток.

9. Введение продукта лазерной активации дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae* (ПЛАДК), защищает экспериментальных животных от радиационных поражений и хронических экотоксических воздействий.

10. Отрицательные результаты активационных проб при экотоксических воздействиях свидетельствуют о развитии гипореактивности иммунной системы и являются основанием для назначения заместительной терапии у мышей: экзогенных БТШ70 и продукта лазерной активации дрожжевой культуры (ПЛАДК).

11. Развитие БТШ-зависимого синдрома гипореактивности иммунной системы является основанием для применения ПЛАДК при экотоксических воздействиях у людей и лазерного облучения периульцерозной зоны у пациентов с затяжным течением язвенной болезни желудка. Введение экзогенного БТШ70 (ПЛАДК) и индукция эндогенных БТШ70 способствуют восстановлению функций иммунной системы и заживлению язвенного дефекта слизистой желудка

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения эффективности вакцинации рекомендовано применение лазерных адьювантов вакцин, которые могут снизить необходимую для ее проведения дозу вакцины более чем в 50 раз

2. Для получения перекрестного иммунного ответа на разные штаммы вируса гриппа рекомендовано использование модифицированных пучком электронов вируса гриппа (H3N2) и парамиксовируса Сендай. Это может сэкономить средства на разработку новых сезонных противогриппозных вакцин.

3. Для защиты от токсических и радиационных поражений рекомендовано применение модифицированного пучком электронов бактериального ЛПС и экзогенного БТШ70.

4. При интенсивных истощающих физических нагрузках рекомендовано использовать в качестве актопротекторов БТШ70 и их производные пролонгированного действия (БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc).

5. Для предотвращения развития геморрагического шока, травматического токсикоза и токсического отека легких рекомендовано использовать рекомбинантный БТШ70.

6. Рекомендован критерий эффективности применения БТШ70 при высокопатогенном гриппе и ингаляционном отравлении фосгеном у мышей – снижение числа PD-1+ и Tim-3+ CD8+ Т-лимфоцитов ниже 20% и 2%, соответственно, или уровня HMGB1(амфотерина) в сыворотке крови ниже 60 пг/л через 3 суток после заражения (интоксикации)

7. Рекомендовано применять БТШ70 для восстановления реактивности иммунной системы при экотоксических воздействиях при отрицательных результатах активационных проб с ЛПС

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Г.А.Баранов Гидродинамические эффекты, вызывающие модификацию полисахаридов при облучении их водного раствора лазерным лучом / Г. А. Баранов, А. А. Беляев, С. Б.

- Оникиенко и др. // Письма в журнал технической физики . – 2002. – Т. 28, Вып. 17. – С. 25–30.
2. Г.А.Баранов Взаимодействие луча CO₂-лазера с падающей каплей жидкости при модификации растворённых в ней биообъектов / Г. А. Баранов А. А. Беляев, С. Б. Оникиенко и др. // Письма в журнал технической физики. – 2003. – Т. 29, Вып. 13. – С. 57–63.
 3. Г.А.Баранов Гидродинамический способ трансформации микробиообъектов / Г. А. Баранов, А. А. Беляев, С. Б. Оникиенко и др. // Письма в журнал технической физики. – 2004. – Т. 30, Вып. 24. – С. 20–25.
 4. Г.А.Баранов Модификация излучением CO₂-лазера биообъектов в водной среде / Г.А. Баранов А. А. Беляев, С. Б. Оникиенко и др. // Квант. электроника, 2005. – Т. 35. – №9. – С. 867–872.
 5. Г.А.Баранов Активация клеток в кавитационном потоке / Г.А. Баранов , А.А. Беляев, А.В. Земляной, С.Б. Оникиенко и др. // Журнал технической физики 2007. –Т.77. – Вып.7. – С. 108 -114.
 6. Оникиенко С.Б. Миелопротективный эффект белков теплового шока и нетоксичных производных микробных липополисахаридов при летальном общем гамма-облучении / С.Б. Оникиенко [и др.]. // Воен. Мед. Журн. – 2008. – №11. – С. 76–77.
 7. Оникиенко С.Б. Разработка инновационных средств защиты от поражений при экстремальных воздействиях на основе лазерных, ядерных и биологических технологий / С.Б. Оникиенко и др.] // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2011. – №4. – С. 78–84.
 8. Оникиенко С.Б. Разработка инновационных стратегий перекрестной защиты военнослужащих корабельного состава и береговых частей ВМФ от радиационных, токсических поражений и биопатогенов / С.Б. Оникиенко [и др.] // Фундаментальная и прикладная гидрофизика. СПб.: Наука. – 2014. –т.7. – №2. – с.95-99.
 9. Чумаков А.В. Некоторые аспекты длительного пребывания под повышенным давлением на предельных глубинах и его последствия с позиции патофизиологии критических состояний / А.В. Чумаков, А.С. Свистов, С.Б. Оникиенко А.В. Земляной // Фундаментальная и прикладная гидрофизика. СПб. – Наука 2014. – т.7. – №2. – с.91-94
 10. Оникиенко С.Б. Средство на основе белков теплового шока-70 для защиты от травматического токсикоза, повышения устойчивости к травме и кровопотере / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестник Российской Военно-медицинской академии 2014. –№2. – С. 116-119.
 11. Оникиенко С.Б. Стратегия активации реакций сверхадаптации при экстремальных глубоководных погружениях на основе применения защитных белков теплового шока-70 / С. Б. Оникиенко [и др.] // Вестник Российской Военно-медицинской академии 2014. – №3. – С. 54-60.
 12. Оникиенко С.Б. Новое поколение актопротекторов – препараты на основе рекомбинантных белков теплового шока (БТШ70) / С.Б. Оникиенко [и др.] // Актуальные проблемы физической и специальной подготовки силовых структур. – 2012. – Ч.2 (ДСП). – №3 (16). – С. 84–89.
 13. Оникиенко С.Б. Разработка стратегий сверхадаптации при экстремальных глубоководных погружениях на основе применения защитных белков стресса – БТШ70 / С.Б. Оникиенко [и др.] // Актуальные проблемы физической и специальной подготовки силовых структур – 2013. – Ч.2 (ДСП). – №2(20). – С.158-161.
 14. Оникиенко С.Б. Средство для повышения устойчивости к кровопотере на основе защитных белков стресса – БТШ70 / С.Б.Оникиенко [и др.] // Актуальные проблемы физической и специальной подготовки силовых структур – 2014. – Ч.2 (ДСП). – №1(24). – С.121-124.

15. Оникиенко С.Б. Средство на основе белков теплового шока-70 для повышения устойчивости к травме и защиты от травматического токсикоза / С.Б.Оникиенко [и др.] // Актуальные проблемы физической и специальной подготовки силовых структур – 2014. – Ч.2 (ДСП). – №1(24). – С.125-128.
16. Оникиенко С.Б. Средство для защиты от токсического отека легких и повышения устойчивости к пульмоноотоксикантам С.Б.Оникиенко [и др.] // Актуальные проблемы физической и специальной подготовки силовых структур – 2014. – Ч.2 (ДСП). – №1(24). – С.129-132

Патенты

17. Баранов Г.А. Патент № 2191604 Российская Федерация. Способ получения биологически активных веществ / Г.А. Баранов., В.А. Левин, А.М. Новосадов, С.Б. Оникиенко С.Б., В.В. Хухарев: заявл. 17.04.00 : опубл. 27.10.02. – Бюллетень №30.
18. Баранов Г.А. Патент №2209085 Российская Федерация. Способ повышения антигенности и иммуногенности биоматериала / Г.А. Баранов, В. А. Левин, А. М. Новосадов., С. Б. Оникиенко, В. В. Хухарев : заявл. 22.06.2001 : опубл. 27.07.2003. – Бюллетень №21
19. Баранов Г.А. Патент №2272420 Российская Федерация. Способ активации дрожжей / Г.А. Баранов, А.В. Земляной, С.Б. Оникиенко, В.В. Хухарев : заявл. 20.06.01 : опубл. 27.03.06 . – Бюллетень №9
20. Оникиенко С.Б. Патент №2345788 Российская Федерация. Способ лазерной вакцинации больных с метастатическими формами рака / С.Б. Оникиенко, А.В. Земляной, В.А. Тарасов : заявл. 02.09.05: опубл. 10.02.09. – Бюллетень №4
21. Оникиенко Б. С. Патент №2344167 Российская Федерация. Хмелевой экстракт / Б.С. Оникиенко, С.Б. Оникиенко, А.В. Земляной, А.В. Фосман: заявл. 13.03.07: опубл. 20.01.09. – Бюллетень №2
22. Оникиенко С.Б. // Патент №2654231 Российская федерация. Способ применения БТШ70 для повышения работоспособности и лечения БТШ-зависимых заболеваний / С.Б. Оникиенко, А.Л. Ниворожкин, А.В. Земляной: заявл. 28.06.2012: опубл.17.05.2018. – Бюлл. №14
23. Оникиенко С.Б. Патент №2662916 Российская Федерация. Способ терапии метастатического рака с использованием вируса Сендай / С.Б. Оникиенко, В.Ю. Кравцов, А.В. Земляной, А.С. Свистов, И.С. Снегирев., В.А. Черешнев: заявл. 05.06.2017 : опубл. 31.07.2018 . – Бюллетень № 22
24. Оникиенко С.Б. Патент №2685867 Российская федерация. Гибридные белки и белковые конъюгаты на основе белка теплового шока-70 (БТШ70) и способы их применения / С.Б. Оникиенко, А.Л. Ниворожкин, А.В. Земляной, М.В. Шорохов, В.И. Перегуда, В.А. Черешнев : заявл. 15.12.2011: опубл. 23.04.2019. – Бюллетень №4
25. Onikienko S.B. Europatent EP №2341932. High energy pulsed electronic field vaccine adjuvants / S.B. Onikienko, A.V. Zemlyanoi., B.A. Margulis, I.V. Guzhova., A.A. Pimenova: filed. 27.05.2009: publ. 09.11.2016. – Patent Bulletin № 45/16
26. Onikienko S.B. // Pat. №9616100 US. Novel methods of use of Hsp70 for increased performance or treatment of Hsp70 related disorders / S.B. Onikienko, A.L. Nivorozhkin, A.V. Zemlyanoi : Filed 06.07. 2014. – Publ.17.04.2017.
27. Onikienko S. B. Pat. №9937241 US. Degradation resistant Hsp70 formulations and uses thereof / S.B. Onikienko., A. Nivorozhkin: Filed 13.11.2012. – Publ. 10.04.2018.
28. Onikienko S.B. Pat. №9217018 US. Hsp70 fusion protein conjugates and using thereof // S.B. Onikienko, A.Nivorozhkin, A.V. Zemlyanoi, M.V. Shorokhov, V.I. Pereguda, V.A. Chereshev : Filed 15.12.2012: Publ. 22.12.2015.
29. Onikienko S.B. Pat. №10052376 US. Zemlyanoi A.V., Margulis B.A., Guzhova I.V., Pimenova A.A. Laser-based vaccine adjuvants / S.B. Onikienko, A.V. Zemlyanoi, B.A. Margulis, I.V.

Монографии

30. Малов Ю.С. Язвенная болезнь / Ю.С. Малов, С.В. Дударенко, С.Б. Оникиенко // СПб, Петростам, 1994. – 206 с.
31. Радиация, экология, здоровье / М.П. Захарченко, В.Х. Хавинсон С.Б. Оникиенко, Г.Н. Новожилов // С-Пб. : Гуманистика, 2003. – 336 с.
32. Развитие инновационной медицины в Государственной Корпорации «Ростех» / под ред. И.Б. Максимова – М. : Изд-во «Офтальмология», 2019. – 168 С.

Работы опубликованные в других изданиях

33. Ю.С.Малов Применение лазерного излучения в лечении хронических гастро-дуоденальных язв / Ю.С. Малов С.Б. Оникиенко, С.В. Дударенко, О.В. Долгий // Тез. докл. международ. конф. «Оптика лазеров-93». – СПб, 1993. – Т. 2. – С. 636.
34. Оникиенко С.Б. Механизмы развития, критерии диагностики и перспективные направления профилактики и коррекции заболеваний органов пищеварения, возникающих под влиянием эколого-профессиональных факторов / С.Б. Оникиенко [и др.] // Матер. Всеармейской научно-практич. конф. «Медицинские последствия экстремальных воздействий на организм» 28-29 марта 2000 г. – СПб, ВМедА, 2000. – С. 177–190.
35. Оникиенко С.Б. Радиопротективное и иммуностимулирующее средство, полученное с помощью лазерных технологий / С.Б. Оникиенко [и др.] // Актуальные вопросы военной полевой терапии, вып. IV «Терапевтическая помощь в экстремальных ситуациях», матер. Всеармейской научно-практич. конф. 23-25 марта 2003 г. – СПб, ВМедА, 2003. – С. 346–349.
36. Оникиенко С.Б. Защитное действие белков теплового шока при экспериментальном остром респираторном дистресс-синдроме / С.Б. Оникиенко [и др.] // Тез. докл. II съезда токсикологов России. – М., 2003. – С. 186–187.
37. Оникиенко С.Б. Перспективы применения белков теплового шока для защиты от радиационного, токсического факторов и биопатогенов / С.Б. Оникиенко [и др.] // Сборн. научн. трудов междунар. научно-практич. конф. «Актуальные проблемы госпитальной медицины» 28 ноября 2003 г. – Севастополь, 2003. – С. 44–46.
38. Оникиенко С.Б. Стресс-ксенобиотерапия – новое направление военной и адаптационной медицины / С.Б. Оникиенко [и др.]. // Сборн. трудов научно-практ. конф. врачей Приволжско-Уральского военного округа, 23-24 ноября 2004 г. – Оренбург, 2004. – С. 560–565.
39. Оникиенко С.Б. Новые средства защиты организма человека от повреждений, возникающих при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестн. РосВМедА. – 2005. – Прил. №1 (13). – С. 125.
40. Onikienko S.B. Stress-xenobiotherapy- the new concept of military and adaptational medicine / S.B. Onikienko [et al.] // Proc.XXXVI World Congress on Military Medicine 5-11 June 2005. – St.Petersburg, Russia, 2005. –P. 222.
41. Оникиенко С.Б. Терапевтические вакцины на основе лазерных технологий / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестн. РосВМедА. – СПб, 2005. – Прил. № 1 (14). – С. 108–109.
42. Оникиенко С.Б. Активация и модификация биоматериалов пучком электронов / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестн. РосВМедА. – СПб, 2005. – Прил. №1 (14). – С. 168–169.
43. Оникиенко С.Б. Наноструктурная модификация микроорганизмов / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестн. РосВМедА. – СПб, 2005. – Прил. №1 (14). – С. 308.

44. Оникиенко С.Б. Создание перспективных средств борьбы с опасными инфекциями, последствиями воздействия высокотоксичных химических соединений путем наноструктурной модификации микроорганизмов и биоматериалов / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестн. РосВМед.А. – СПб, 2007. – Прил. №1 (17). – С. 333.
45. Оникиенко С.Б. Новое поколение адъювантов вакцин / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестн. РосВМед.А. – СПб, 2007. – Прил. №1(17). – С. 333.
46. Оникиенко С.Б. Применение масляного экстракта хмеля для профилактики и лечения патологических состояний, связанных с нарушениями функций рецепторов врожденного иммунитета / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестн. РосВМед.А. – СПб, 2007. – Прил. №1 (17). – С. 334
47. Onikienko S. Laser-induced and exogenously introduced Hsp70 serve as the efficient adjuvants for influenza vaccine / S. Onikienko [et al.] //2nd International Congress of Stress Research. – Budapest, 2007 – P. 265.
48. Onikienko S. Non-toxic lipopolysaccharide derivatives and exogenous Hsp70 protect against lethal septic shock and immuno-metabolic injuries induced by bacterial endotoxin and xenobiotics / S. Onikienko [et al.] // 2nd International Congress of Stress Research. – Budapest, 2007. – P. 350.
49. Оникиенко С.Б. Защитные и патологические реакции сверхкомпенсации при воздействии на организм токсических веществ / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестн. РосВМед.А. – СПб, 2008. – Прил. №1(21). – С. 257–262.
50. Оникиенко С.Б. Внеклеточный БТШ70 и нетоксичные производные бактериального эндотоксина – перспективные средства защиты от от высокотоксичных химических соединений и биопатогенов / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестн. РосВМед.А. – СПб, 2008. – Прил. №1(21). – С. 246–256.
51. Sokolovskii G.S. Hsp70 and ceramide release by diode laser-treated mouse skin cells in vivo / G.S. Sokolovskii, S.B. Onikienko, A.V. Zemlyanoi [et al.] // Laser Optics. – Sankt-Peterburg, 2010. – P.187–188.
52. Onikienko S.B. Radiation injury mitigating effects of exogenous Hsp70 and non-toxic bacterial LPS derivatives / S.B. Onikienko [et al.] // V Internat Symp. “Heat Shock Proteins in Biology and Medicine”. – Woods Hole, USA, 2010. – P. 51.
53. Оникиенко С.Б. Перспективы использования стресс-ксенобиотерапии для профилактики поражений персонала объектов по уничтожению химического оружия. / С.Б. Оникиенко [и др.]. // Токсикология, гигиена, профпатология при работе с опасными химическими веществами. Информационный сборник № 5. – С-Пб. 2011. – С. 89–92.
54. Оникиенко С.Б. Средства защиты от радиационных поражений на основе экзогенных белков теплового шока и нетоксичных производных бактериальных липополисахаридов / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестник Российской Военно-Медицинской Академии. – 2011. – Прил. №1 (33). – С. 132.
55. Оникиенко С.Б. Защитный эффект модифицированного эндотоксина и экзогенных белков теплового шока при интоксикации электрофильными токсическими веществами / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестник Российской Военно-Медицинской Академии. – 2011. – Прил. №1 (33). – С. 132.
56. Оникиенко С.Б. Применение экзогенных белков теплового шока при поражении высокотоксичными веществами / С.Б. Оникиенко [и др.] // Вестник Российской Военно-медицинской Академии. – 2011. – Прил. №1 (33). – С. 133.
57. Черешнев В.А. Разработка средств защиты от поражений при экстремальных воздействиях на основе инновационных технологий модификации биомишеней физическими факторами высокой интенсивности и химической модификации белков теплового шока / В.А. Черешнев, С.Б. Оникиенко, С.С. Алексанин [и др.] // Сб. статей II международной научно-практической конференции «Высокие технологии,

фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». – СПб, 2011. – Т. 2. – С. 340–353.

58. Onikienko S.B. Exogenous Hsp70 serves as potent actoprotector and mitigates exhaustive exercise-induced muscle damage / S.B. Onikienko [et al.] // Proc. V Internat. Congr. «Stress response in biology and medicine». – Quebec, Canada 2011. – P. 165.
59. Onikienko S.B. Mitigation of injuries induced by severe poly-extreme stressors using innovative technologies focused on pulsed power biotarget modification and heat shock protein-70 based pharmaceutical agents / S.B. Onikienko [et al.] // Proc. of 39-th World Congress on Military Medicine. – Abuja, Nigeria, 2011. – P. 80.
60. Оникиенко С.Б. Профилактика и коррекция иммунных и метаболических нарушений, возникающих при взаимодействии бактериального эндотоксина и липофильных ксенобиотиков с рецепторами врожденного иммунитета / С.Б. Оникиенко [и др.] // Донозоология и здоровый образ жизни. – 2012. – №2 (11). – С. 16–30.
61. Оникиенко С.Б. Разработка инновационных стратегий медицинской защиты при экстремальных воздействиях / С.Б. Оникиенко [и др.] // Сборник научных трудов, посвященный 90-летию со дня рождения профессора Г.И.Алексеева. – С-Пб: ЭЛБИ. – 2012. – С. 180–199.
62. Onikienko S.B. Novel actoprotectors based on the long-acting recombinant Hsp70 derivatives – pegylated Hsp70 and Hsp70-Fc antibody fragment fusion protein / S.B. Onikienko [et al.] // Proc VI Internat. Symp. “Heat Shock Proteins in Biol. and Medicine”. – Alexandria, USA, 2012. – P. 8.
63. Onikienko S.B. Recombinant human Hsp70 and their long-acting derivatives serve as potent neuroprotectors in experimental decompression sickness and ischemic stroke animal models / S.B. Onikienko [et al.] // Proc VI Internat. Congr. “Heat Shock Proteins in Biology and Medicine”, 18-22 Aug 2013. – Sheffield, GB, 2013. – P. 31
64. Оникиенко С.Б. Белки теплового шока-70, производные БТШ70 пролонгированного действия – новое поколение средств для повышения радиорезистентности организма / С.Б.Оникиенко [и др.] // Актуальные проблемы физической и специальной подготовки силовых структур – 2014. – №1. – С.96-103.
65. Земляной А.В. Применение экзогенных белков теплового шока для предотвращения развития токсического отека легких / А.В.Земляной, С.Б.Оникиенко, В.К. Бородавко [и др.] // Амурский медицинский журнал – 2015. – №3. – С. 49-52.
66. Земляной А.В. Ядерные технологии получения инновационных средств защиты от биопатогенов, токсических и радиационных поражений / А.В. Земляной, С.Б. Оникиенко С.Б., С.А. Дулов [и др.] // Тезисы докладов научно-практич. форума «Ядерные технологии на страже здоровья», посвященного 70-летию ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. – М. – 2016. – С. 92-93.
67. Оникиенко С.Б. Молекулярные механизмы защитного эффекта БТШ70 и модифицированного пучком электронов бактериального эндотоксина при ингаляционном отравлении фосгеном и высокопатогенном гриппе у мышей / С.Б. Оникиенко [и др.] // Известия Российской военно-медицинской академии. – С-Пб. – 2017. – Т.36. – № 2 (прил1). – С.140.
68. Оникиенко С.Б. Перспективность применения белков теплового шока при глубоководных погружениях / А.В. Земляной, С.Б. Оникиенко, С.А. Дулов [и др.] // Актуальные проблемы медико-санитарного обеспечения деятельности объектов морской техники, предприятий с вредными и опасными производственными факторами, а также экологического благополучия территорий, обслуживаемых ФМБА: Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 50-летию ФГУП «НИИ промышленной и морской медицины» ФМБА / под ред. А.В. Иванченко. – СПб: Сборка, 2017. – С. 74 – 77.

Автор выражает благодарность соавторам за содействие в выполнении работы и помощь в проведении исследований: директору Центра Лазерной Техники и Технологии НИИЭФА им. Д.В. Ефремова д.т.н. Г.А. Баранову (модификация биомишенной лазерным излучением и пучком электронов); Главному научному сотруднику НИИ Цитологии РАН д.б.н. Б.А. Маргулису (обеспечение БТШ70 и определение его содержания в биопробах); заведующему лабораторией токсикологии НИИ ГПЭЧ ФМБА России к.м.н. А.В. Земляному (выявление защитного эффекта модифицированного ЛПС и БТШ70 на моделях патологических состояний, биохимические исследования), зав. отделением эндоскопии 442 ОВКГ [Ю.В.Киселеву] (лазерная терапия длительно не рубцующихся язв желудка), ст.преподавателю кафедры военной эпидемиологии ВМА им. С.М. Кирова к.м.н [А.М. Новосадову] (эпидемиологический анализ заболеваний при экотоксических нагрузках), с.н.с. НИЛ военной терапии ВМА им. С.М. Кирова К.М. Светиковой (морфометрия биоптатов), ст. лаборанту кафедры военно-полевой терапии ВМА им. С.М. Кирова Е.Н. Михальцовой (иммунологические исследования), с.н.с. лаборатории клинической иммунологии ВЦЭРМ им. А.М.Никифорова к.б.н. Н.В.Бычковой (проточная цитометрия), с.н.с. кафедры военно-полевой терапии ВМА им.С.М. Кирова, к.х.н. А.И. Губанову (хроматографические исследования), директору ООО «Альтернативные инновационные технологии» А.Л. Ниворожкину (обеспечение БТШ70-ПЭГ, БТШ70-Fc), с.н.с. Института биофизики клетки РАН д.б.н. М.Г. Винокурову (определение «кислородного взрыва» в лейкоцитах).