

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



Мугинов Рафаэль Ирекович

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ
АКТИВНОСТИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИИ РОДА
SINORHIZOBIVUM

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор



А.Р.Мавзютов

Уфа – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

Перечень условных обозначений (сокращений)	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. Обзор литературы	8
1.1. Структура и биологическая роль липополисахаридов бактерий	8
1.2. Применение липополисахаридов в медицине	13
1.3. Характеристика бактерий рода <i>Sinorhizobium</i> и их значение	19
1.4. Иммунодефициты и их коррекция	20
ГЛАВА II. Материалы и методы	26
2.1. Материалы исследований	26
2.1.1. Лабораторные животные	26
2.1.2. Препарат создания модели иммунодефицита	27
2.1.3. Препарат группы сравнения	30
2.1.4. Фракции липополисахаридов <i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Escherichia coli</i>	31
2.2. Методы исследований	31
2.2.1. Расчет органомерических характеристик паренхиматозных органов	31
2.2.2. Статистическая обработка	34
ГЛАВА III. Результаты и обсуждение	36
3.1. Анализ органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов <i>Sinorhizobium meliloti</i>	36
3.2. Анализ органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
3.3. Анализ органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов <i>Escherichia coli</i>	40

3.4. Сравнительная характеристика органомерических исследований	
липополисахаридов	42
ВЫВОДЫ	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	47

Перечень условных обозначений (сокращений)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЛПБК - липополисахарид-белковые комплексы

ЛПС - липополисахарид

ЛСБ – липополисахарид-связывающий белок

МК – массовый коэффициент

ОДА – опорно-двигательный аппарат

СКВ – системная красная волчанка

ЦНС – центральная нервная система

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. За последние годы наблюдается снижение иммунологической реактивности большей части населения, что выражается в повышении уровня острых и хронических инфекционных заболеваний, связанных с условно-патогенными и оппортунистическими инфекциями. На фоне массового приема антибактериальных противогрибковых, противовирусных и других химиотерапевтических препаратов наблюдается значительное подавление иммунореактивности организма и снижение его защитных свойств. В связи с этим большой интерес современной медицинской науки представляет разработка и применение иммунокорректирующих препаратов в комплексной терапии больных с заболеваниями, характеризующимися вялым, рецидивирующим течением с устойчивостью к адекватной этиотропной терапии (Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С., 2003).

Известны различные группы препаратов, обладающих иммуномодулирующими эффектами, однако иммунокорректоры из клеточной стенки грамотрицательных бактерий незаслуженно обходят стороной, хотя их эффективность периодически обсуждается и доказывается в научных публикациях. Клеточная стенка таких бактерий содержит уникальный полифункциональный компонент – липополисахариды (ЛПС), не имеющий аналогов в животном мире, который отвечает за иммунологические, биохимические и патофизиологические особенности течения инфекционного процесса. Широкий спектр биологических свойств ЛПС объясняет большое внимание клиницистов и экспериментаторов к данному макромолекулярному компоненту микробной клетки (Сибиряк С.В., Алехин Е.К., 2008).

В современной медицине широко используются разные иммуномодуляторы микробного происхождения: ГМДП, ИРС-19, рибомунил, анатоксин стафилококковый очищенный (АСО), Иммуновак-ВП-4 и многие другие. Клинический эффект этих средств установлен многими авторами (Голощапова

Е.Н., 1997; Гремякова Т.А., Фомченков В.М., Фурсова Н.К., Волковой К.И., 1996; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1997; 2001), однако практически нет данных и исследований применения и эффективности ЛПС таких широко распространенных бактерий, как бактерии рода *Sinorhizobium*. Интерес к этому роду бактерий вызван тем, что ЛПС патогенных грамотрицательных микроорганизмов содержит токсичный для человека липид А, а бактерии рода *Sinorhizobium* не представляют никакой опасности для организма, так как являются широко распространенными почвенными симбионтами растений (Затовская Т.В., 2012). В то же время фракции ЛПС этих бактерий с биохимической точки зрения должны обладать схожими иммуномодулирующими эффектами, что не исключает возможности их использования в качестве препаратов лечебно-диагностического назначения (Лиходед В.Г., Ющук Н.Д., Яковлев М.Ю., 1996).

Таким образом, обзор литературных источников показывает значение применения ЛПС микробного происхождения в качестве иммуномодуляторов, однако экспериментальное применение и сравнительная характеристика ЛПС бактерий рода *Sinorhizobium* практически не изучено, что определяет актуальность наших исследований.

Цель исследования. Провести сравнительную характеристику иммуномодулирующих свойств очищенных липополисахаридов бактерий рода *Sinorhizobium* в эксперименте на лабораторных животных.

Задачи исследования.

1. Охарактеризовать изменения органомерических характеристик мышей после применения фракций липополисахаридов бактерий рода *Sinorhizobium* на фоне иммунодефицита.
2. Изучить влияние фракций липополисахаридов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* на органомерические показатели иммунодефицитных мышей.
3. Провести сравнительную оценку влияния липополисахаридов бактерий

Sinorhizobium meliloti, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* на органомерические характеристики мышей.

Научная новизна и теоретическая ценность работы. Новизна исследования заключается в сравнительном изучении иммуномодулирующих свойств ЛПС бактерий рода *Sinorhizobium* при экспериментальном иммунодефиците лабораторных мышей – их влияния на изменения органомерических характеристик.

Научно-практическая значимость. Работа представляет научно-практический интерес, заключающийся в сравнительном изучении иммуномодулирующих свойств ЛПС бактерий рода *Sinorhizobium*. Полученные в результате работы данные могут быть использованы в разработке новых безопасных иммуномодулирующих препаратов.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура и биологическая роль липополисахаридов бактерий

Углеводы и липиды у грамотрицательных бактерий в их стенке образуют сложный комплекс – липополисахарид (ЛПС). Он состоит из трех структурных компонентов: липид А, сердцевинный полисахарид и О-боковая углеводная цепь (Рис. 1).

ЛПС обладает свойствами эндотоксина, выраженными антигенными свойствами (О- антиген). Липид А реализует токсические свойства полисахарида, и, если из состава ЛПС удалить липид А его токсические свойства теряются. Сердцевинный полисахарид имеет антигенные и иммуномоделирующие свойства. О- боковая цепь является специфическим компонентом. В зависимости от ее строения проводятся серологическое типирование бактерий. Она состоит из различных углеводов (галактоза, глюкоза, манноза), специфичных для бактерий сахаров: абеквоза, паратоза, политоза (Novotny A. M., Thomas S., Duron O.S., 1963).

Бактерии, имеющие полный комплекс ЛПС, образуют S-колонии. Эти колонии имеют ровные края и гладкую поверхность, а также более выраженные патогенные свойства. Бактерии с нарушенным синтезом ЛПС (нет О-боковой цепи и части сердцевинного полисахарида) образуют R-колонии: неровный край, шероховатая поверхность, сниженные патогенные свойства (Rietschel et al., 1994).

Данные полногеномного секвенирования внесли значительный вклад в понимание механизмов биосинтеза ЛПС различных грамотрицательных бактерий и показали, что существенную роль в структурном разнообразии ЛПС играет горизонтальный перенос генов (Федореева Л.И., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С., 1989). Гены биосинтеза трех структурных областей ЛПС обычно находятся в различных частях хромосомы, часто в виде отдельных локусов. Большинство генов биосинтеза ЛПС, кодирующих ферменты метаболизма

углеводов и липидов, делятся на три основные группы: гены биосинтеза нуклеотид -сахаров и жирных кислот; гены, кодирующие трансферазы; гены процессинга (Brandenburg K., Andra J., Miiller M., Koch M.H.J., Garidelc P., 2003; Brandenburg K., Jurgens G., Andra J., Lindner B., Koch M., Blume A., Garide P., 2002).

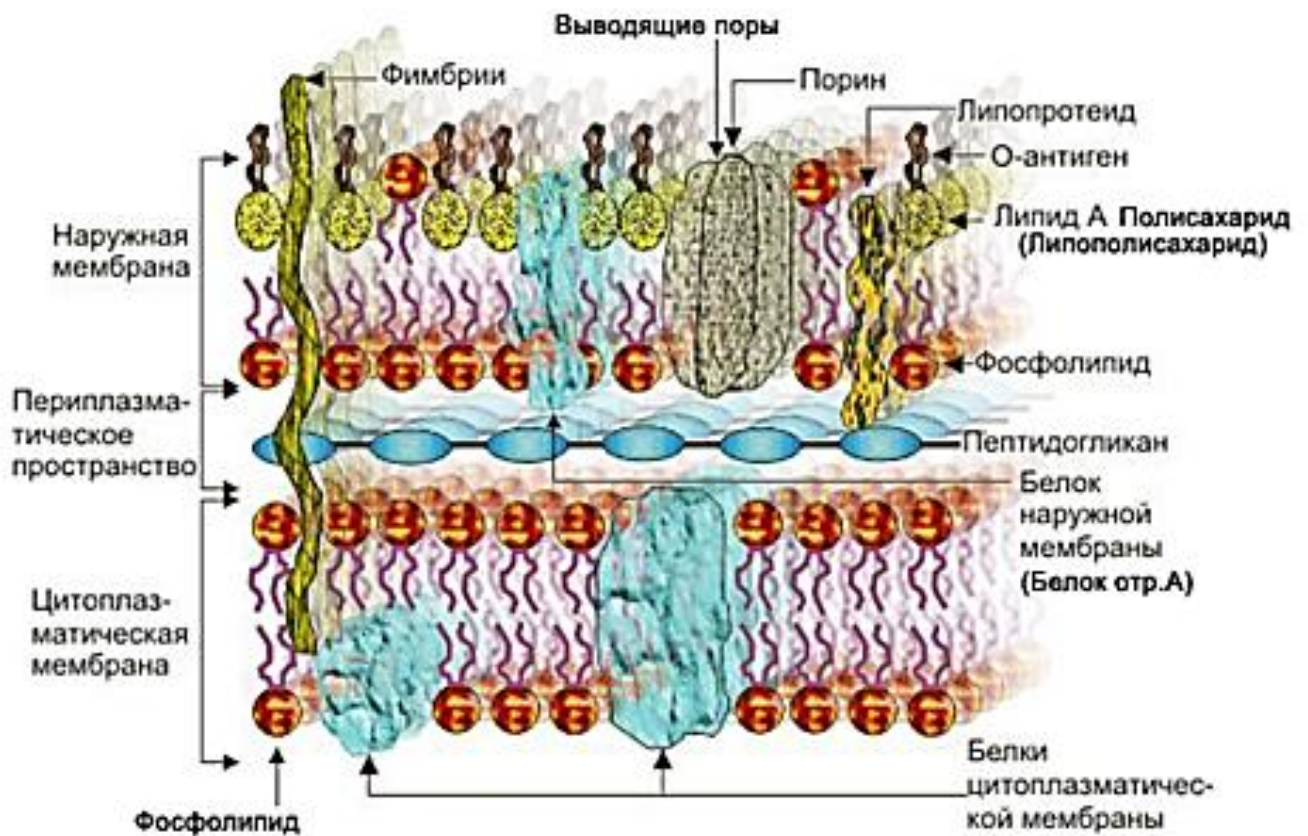


Рисунок 1 - Строение стенки грамотрицательных бактерий (Rietschel et al., 1994).

В процессе своей жизнедеятельности бактериальные клетки активно взаимодействуют с окружающей средой, а патогенные бактерии - с организмом хозяина. В последнем случае это взаимодействие осуществляется, со стороны макроорганизма на уровне клеток и гуморальных факторов - компонентов иммунной системы, а со стороны бактерий - на уровне макромолекул и их комплексов, расположенных на поверхности бактериальных клеток

(Набережных Г.А., Хоменко В.А., Красикова И.Н., Ким Н.Ю., Соловьева Т.Ф., 1996).

Бактерии с нарушенным синтезом ЛПС (нет О-боковой цепи и части сердцевинного полисахарида) образуют R-колонии: неровный край, шероховатая поверхность, сниженные патогенные свойства (Rietschel et al., 1994).

Липополисахарид занимает около 45% ее поверхности и представляет собой амфифильную молекулу, содержащую гидрофобный липидный компонент (липид А) и ковалентно связанную с ним гидрофильную полисахаридную часть (Lugtenberg B., Van Alphen L., 1993). В наружной мембране клетки ЛПС специфически взаимодействуют с белками, образуя устойчивые к химическим воздействиям ЛПС-белковые комплексы (ЛПБК). Эти комплексы играют важную роль в организации и функционировании бактериальной мембраны и в значительной степени определяют ее свойства. Специфическое взаимодействие ЛПС с белком обеспечивает формирование пространственной структуры последнего и закрепление его в мембране. Важным доказательством существования связи между белком и ЛПС является функциональная активность комплекса, которая проявляется только при наличии обоих компонентов (Elsbach P., Weiss J., 1993).

Изучением структуры ЛПС были заняты десятки групп исследователей в разных странах мира, и в этом направлении достигнуты существенные успехи (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962; Гершанович М.Л., 1982; Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Бабаянц А.А., 1996; Лиходед В.Г., Ющук Н.Д., Яковлев М.Ю., 1996; Куцепко С.А., 2004), что особенно важно для практической медицины, так как полисахаридная часть ЛПС часто является характерным антигеном патогенных бактерий, узнаваемым иммунной системой макроорганизма.

Способность ЛПС образовывать с белками наружной мембраны комплексы, подтверждена многими экспериментальными фактами, как *in vitro*, так и *in vivo*, однако данные о надмолекулярной структуре и свойствах ЛПБК, их поведении

в водных средах весьма ограничены. В то же время, проявление физиологической активности эндотоксинов во многом определяется их третичной структурой. Поэтому лишь располагая соответствующими данными о макромолекулярной организации ЛПС и ЛПБК, можно достаточно полно решить основную задачу биохимии эндотоксинов - установить молекулярные механизмы их биологического действия (Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Бабаянц А.А., 1996).

Взаимодействие ЛПС с белком не ограничивается только наружной мембраной бактерий. При попадании в макроорганизм ЛПС взаимодействуют с белками сыворотки и бактерицидными белками организма хозяина и являются мишенью для антибактериальных веществ поликатионной природы, используемых при лечении бактериальных инфекций (Онищук О.П., Шарыпова Л.А. Курчак О.Н., 2005). В этом случае комплексы ЛПБК, выделенные из бактериальной мембраны, могут служить удобной моделью для изучения ЛПС - белковых взаимодействий.

Среди широкого спектра биологической активности ЛПС и ЛПБК, особое внимание исследователей привлекает их токсичность и способность активировать клетки иммунной системы. В настоящее время механизм проявления активности эндотоксина в макроорганизме достаточно понятен. Результатом специфического взаимодействия ЛПС или ЛПБК с клетками макроорганизма является биосинтез активных медиаторов - цитокинов, которые при низкой концентрации регулируют работу иммунной системы организма, а при высокой - вызывают развитие сложной гаммы токсических эффектов, таких как пирогенность, лейкопения, септический шок, объединяемых понятием «бактериальный эндотоксикоз» (Ронин В.С., 1989). В связи с этим разрабатываются способы нейтрализации токсического действия ЛПС и использования его ценных свойств. Для этих целей активно исследуются антибиотики или синтезированные на их основе пептиды; моно-клональные антитела к ЛПС; ингибиторы цитокинов; малотоксичные ЛПС, обладающие

свойствами антагонистов; липосомальные вакцины (Хиггинс К., 2010), а также вещества, нейтрализующие действие ЛПС за счет образования с ними комплексов.

Среди последних веществ наиболее перспективными являются поликатионные антибактериальные белки, пептиды и их синтетические аналоги, как новые потенциальные антисептические препараты, для которых ЛПС является важной мишенью благодаря высокому отрицательному заряду за счет фосфатных, пирофосфатных и карбоксильных групп, локализованных во внутренней части кора и липиде А - токсическом центре ЛПС.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые при изучении взаимодействий ЛПС с различными белками, многие биохимические и биофизические факторы, лежащие в их основе, остаются до конца неизученными (Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Бабаянц А.А., 1996).

ЛПС высвобождается из бактериальных клеток при их гибели в результате аутолиза под действием различных токсинов и антибиотиков. Из ЖКТ ЛПС могут проникать в ткани и органы через портальную вену или через кишечную лимфатическую систему. Это приводит к различным изменениям в организме: снижает количество употребляемой пищи, активность липопротеинлипаз в мышцах и костях, содержание липопротеинов в плазме крови, синтез жирных кислот печени, увеличивает в крови уровень ненасыщенных жирных кислот и триглицеридов, нарушается баланс клеточного гликогена. ЛПС вызывают клинические проявления токсикоза, сопровождающегося слабостью, одышкой, нарушением сердечной деятельности. Низкие концентрации ЛПС стимулируют фагоцитоз, вызывают агрегацию тромбоцитов, повышают температуру тела и липосидеремию. Они вызывают неспецифическую пролиферацию Т и В клеток, активируют макрофаги, усиливают иммунный ответ, повышают противоопухолевую резистентность, естественную устойчивость к инфекциям и аутоиммунные реакции (Freudenberg M.A., Galanos C., 1989).

1.2. Применение липополисахаридов в медицине

Некоторые бактериальные липополисахариды нашли практическое использование в медицине, например, это пирексал и пирогенал. Они выделены из различных грамотрицательных патогенов, и их названия отражают характерное для них свойство – повышать температуру тела живого организма (Должко Д.В., 2017).

Пирогенал можно рассматривать в качестве поддающегося дозировке неспецифического стрессора, вызывающего санациогенный стресс, мобилизующего защитные силы организма (Голощапова Е.Н., 1997). Так, пирогенал как санациогенный стрессор содействует адекватной перестройке на новом уровне реципрокных взаимоотношений между симпатическим и парасимпатическим тонусом. ЛПС, в-первых, применяются для стимуляции иммунитета и неспецифической резистентности организма: при более высокой температуре интенсивнее происходит синтез антител, интерферонов, интерлейкинов и других цитокинов, отмечается общее повышение интенсивности окислительного метаболизма и усиленное образование токсичных для микроорганизмов и паразитов свободных радикалов, усиление лейкопоэза и развитие гиперлейкоцитоза, хемотаксиса и фагоцитарной активности лейкоцитов. Именно с иммуностимуляцией связывают эффективность пиротерапии при многих вялотекущих, хронических инфекционных заболеваниях, в норме протекающих без температурной реакции, без выраженного воспаления и без формирования напряжённого иммунитета. Во-вторых, эффективность пиротерапии при некоторых заболеваниях связана с повышением проницаемости сосудов и тканевых барьеров не только для иммунных клеток и факторов гуморального иммунитета, но и для антибиотиков и других лекарств. С повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера для антибиотиков и

химиопрепаратов связывают эффективность пиротерапии при сифилитическом энцефалите (прогрессивном параличе), токсоплазмозе ЦНС и других нейроинфекциях; для антидепрессантов и антипсихотиков – при резистентных депрессиях и психозах. С повышением проницаемости гемато-простатического барьера для антибиотиков связывают эффективность пиротерапии при хроническом простатите. В-третьих, эффективность пиротерапии связана со свойствами самих возбудителей некоторых заболеваний, которые не могут размножаться или плохо размножаются при повышении температуры тела хозяина (Б.В.Пинегин, А.М.Борисова, Н.В.Хоршилова и др., 1996; Манько В.М., Петров Р.В., Хаитов Р.М., 2002).

Среди широкого спектра биологической активности ЛПС и ЛПБК, особое внимание исследователей привлекает их токсичность и способность активировать клетки иммунной системы. В настоящее время механизм проявления активности эндотоксина в макроорганизме достаточно понятен. Результатом специфического взаимодействия ЛПС или ЛПБК с клетками макроорганизма является биосинтез активных медиаторов - цитокинов, которые при низкой концентрации регулируют работу иммунной системы организма, а при высокой - вызывают развитие сложной гаммы токсических эффектов, таких как пирогенность, лейкопения, септический шок, объединяемых понятием «бактериальный эндотоксикоз» (Ронин В.С., 1989). В связи с этим разрабатываются способы нейтрализации токсического действия ЛПС и использования его ценных свойств. Для этих целей активно исследуются антибиотики или синтезированные на их основе пептиды; моно-клональные антитела к ЛПС; ингибиторы цитокинов; малотоксичные ЛПС, обладающие свойствами антагонистов; липосомальные вакцины (Хиггинс К., 2010), а также вещества, нейтрализующие действие ЛПС за счет образования с ними комплексов.

Среди последних веществ наиболее перспективными являются поликатионные антибактериальные белки, пептиды и их синтетические

аналоги, как новые потенциальные антисептические препараты, для которых ЛПС является важной мишенью благодаря высокому отрицательному заряду за счет фосфатных, пирофосфатных и карбоксильных групп, локализованных во внутренней части кора и липиде А - токсическом центре ЛПС.

Иммунная система — сложная функциональная структура человеческого организма, которая должна, с одной стороны, поддерживать постоянство клеточного состава органов и тканей, а с другой — отражать агрессию проникших в организм патогенных факторов (Караулов А.В., 1999).

Несмотря на значительные успехи, достигнутые при изучении взаимодействий ЛПС с различными белками, многие биохимические и биофизические факторы, лежащие в их основе, остаются до конца неизученными.

Микробные липополисахариды преимущественно влияют на В-лимфоциты и продукцию эндогенных интерферонов. Это связано с взаимодействием липополисахаридов с ЛПС-связывающим белком (рис. 2). Липополисахарид-связывающий белок (ЛСБ, lipopolysaccharide binding protein, LBP) — секретируемый белок, компонент острой фазы воспаления, который связывает с высокой афинностью бактериальный липополисахарид и усиливает связывание с ним CD14. Таким образом, ЛСБ обеспечивает первый этап в процессе моноцитарного иммунного ответа (Воробьев А.А., 2002).

За последние годы для стимуляции иммунитета чаще используется продигозан, который лучше переносится пациентами, он стимулирует факторы неспецифической и специфической резистентности организма, активирует иммунокомпетентные клетки (В- и Т-лимфоциты), индуцирует продукцию эндогенных интерферонов, повышает активность дополнительных факторов иммунитета (макрофаги и др.), увеличивает фагоцитарную активность, усиливает антителообразование, выход в циркуляторное русло В-лимфоцитов, повышает уровень иммуноглобулинов, способствует подавлению инфекционно-воспалительных процессов. Он обладает способностью

активировать неспецифическую реактивность организма к инфекции, ускоряя процесс выздоровления. При его введении наблюдаются пирогенный эффект, кратковременная лейкопения, сменяющаяся лейкоцитозом (Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С., 1983).

Наличие значительных побочных эффектов у иммуномодуляторов этого класса определяет необходимость поиска новых природных липополисахаридов, обладающих меньшей токсичностью и пирогенностью, но имеющих такую же высокую иммунотропную активность.

В настоящее время механизм проявления активности эндотоксина в макроорганизме достаточно понятен. Результатом специфического взаимодействия ЛПС или ЛПБК с клетками макроорганизма является биосинтез активных медиаторов - цитокинов, которые при низкой концентрации регулируют работу иммунной системы организма, а при высокой - вызывают развитие сложной гаммы токсических эффектов, таких как пирогенность, лейкопения, септический шок, объединяемых понятием «бактериальный эндотоксикоз» (Ронин В.С., 1989).

В связи с этим разрабатываются способы нейтрализации токсического действия ЛПС и использования его ценных свойств. Для этих целей активно исследуются антибиотики или синтезированные на их основе пептиды; моноклональные антитела к ЛПС; ингибиторы цитокинов; малотоксичные ЛПС, обладающие свойствами антагонистов; липосомальные вакцины (Хиггинс К., 2010), а также вещества, нейтрализующие действие ЛПС за счет образования с ними комплексов.

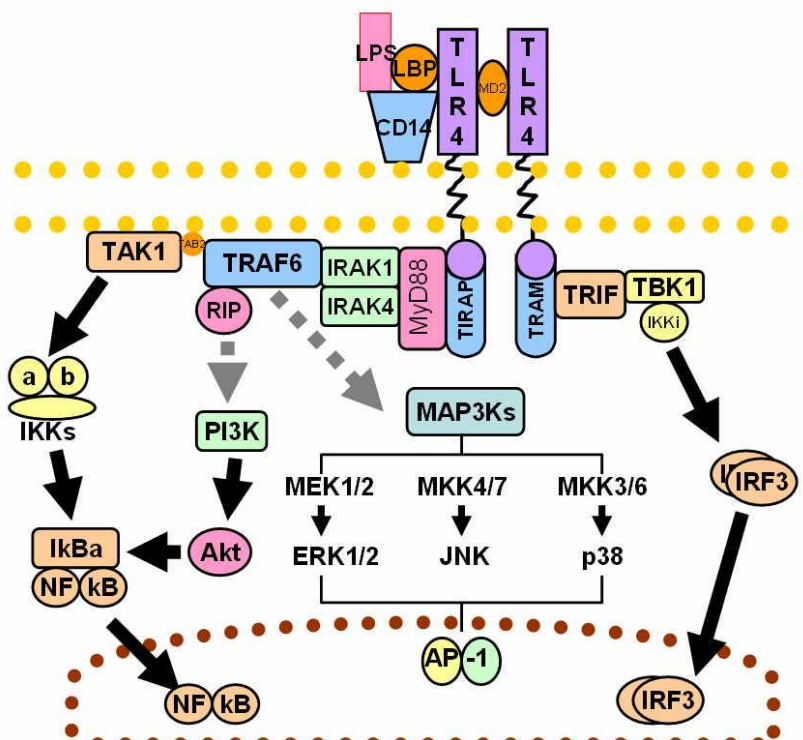


Рисунок 2 - Эффекты взаимодействия ЛПС с с ЛПС-связывающим белком (Dziarski R, Wang Q, Miyake K, et al., 2001)

В настоящее время механизм проявления активности эндотоксина в макроорганизме достаточно понятен. Результатом специфического взаимодействия ЛПС или ЛПБК с клетками макроорганизма является биосинтез активных медиаторов - цитокинов, которые при низкой концентрации регулируют работу иммунной системы организма, а при высокой - вызывают развитие сложной гаммы токсических эффектов, таких как пирогенность, лейкопения, септический шок, объединяемых понятием «бактериальный эндотоксикоз» (Ронин В.С., 1989). В связи с этим разрабатываются способы нейтрализации токсического действия ЛПС и использования его ценных свойств. Для этих целей активно исследуются антибиотики или синтезированные на их основе пептиды; моно-клональные антитела к ЛПС; ингибиторы цитокинов; малотоксичные ЛПС, обладающие свойствами антагонистов; липосомальные вакцины (Хиггинс К., 2010), а также вещества, нейтрализующие действие ЛПС за счет образования с ними комплексов.

Доказательством перспективности изыскания новых иммуномодуляторов среди липолисахаридов является синтез сальмозана, представляющего полисахаридную фракцию соматического О-антигена бактерий брюшного тифа. Этот препарат получен путем депротеинизации фенолы антигена с последующим удалением липида А при гидролизе в ацетате. Сальмозан малтоксичен, практически не содержит белков и липидов. Введенный мышам сальмозан играет в организме роль индуктора пролиферации и дифференциации стволовых клеток, стимулирует антителогенез и фагоцитарную активность лейкоцитов и макрофагов, повышает титр лизоцима в крови, стимулирует неспецифическую резистентность к инфекциям (Гремякова Т.А., Фомченков В.М., Фурсова Н.К., Волковой К.И., 1996).

Способность сальмозана стимулировать иммунитет проявляется как у животных, имеющих интактный иммунологический статус, так и у животных с иммунитетом, угнетенным облучением. Введение этого полисахарида до облучения позволяло повысить сниженную естественную резистентность к экспериментальной инфекции в 200-900 раз.

Анализ стимулирующего воздействия сальмозана на пролиферативные процессы в лимфоидных и кроветворных органах выявил его интересные особенности в сравнении с ранее известными липополисахаридами. Выяснилось, что сальмозан вызывает фазовые изменения пролиферации: короткий период снижения интенсивности пролиферативных процессов сменяется их усилением. Поскольку повторные инъекции не усиливают эффект, то предполагается, что стимуляция опосредована через образование эндогенных регуляторных факторов, тем более что у сальмозана митогенных свойств не найдено, что объясняется отсутствием в его молекуле липида А (Гремякова Т.А., Фомченков В.М., Фурсова Н.К., Волковой К.И., 1996).

1.3. Характеристика бактерий рода *Sinorhizobium* и их значение

Sinorhizobium — род бактерий класса альфа-протобактерий, входящий в группу клубеньковых бактерий (рис.3). Это грамотрицательные почвенные бактерии, способные к фиксации азота. Вступают в симбиотические отношения с представителями семейства бобовых (Cropan G.E., Keating D.H., 2004).

Бактерии рода колонизируют клетки корня растения, образуя корневые клубеньки; здесь, в условиях с пониженным содержанием кислорода, они преобразуют атмосферный азот в аммиак, обеспечивая растению доступ к органическому азоту в форме глутамина или уридов. В обмен растение поставляет бактериям сахара, образовавшиеся в ходе фотосинтеза, и обеспечивает им анаэробные условия (Marketon M.M., Gronquist M.R., Eberhard A., González J.E., 2002).

Впервые микроорганизм из корневых клубеньков бобовых выделил, получил в культуру нидерландский учёный Бейринк в 1888 году. Это прямые или слегка изогнутые палочковидные бактерии размером $0,6—1,0 \times 1,5—3,0$ мкм. Не образуют спор, подвижные. Несут 1—4 жгутика, расположенных перитрихально. Располагаются одиночно или попарно.

По культуральным свойствам эти бактерии являются хеморганогетеротрофами, облигатными аэробами. Не требуют специфических факторов для роста на искусственных питательных средах. Способны использовать относительно большой спектр органических веществ как единственный источник углерода (N-ацетилглюкзамин, α -аланин, β -аланин, арабинозу, аспартат, дульцит), способны расти в LB-бульоне. На агаризованных питательных средах образуют выпуклые, круглые гладкие непигментированные или слабо-бежевые колонии.

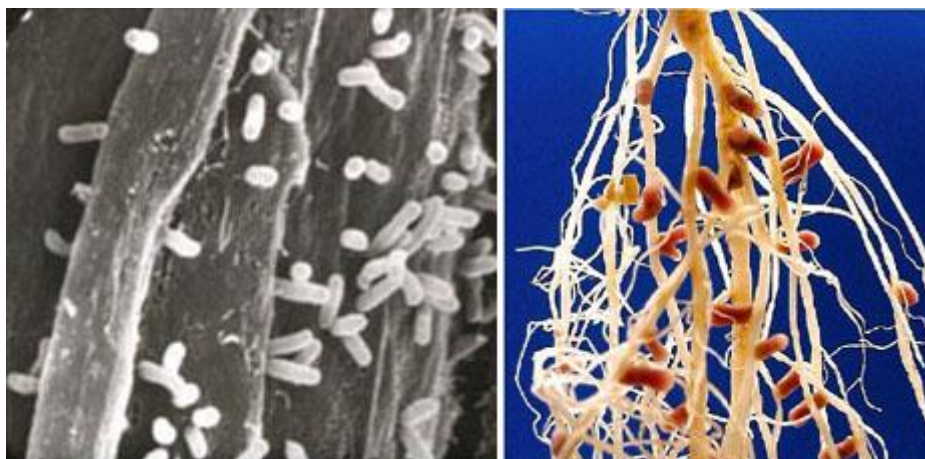


Рисунок 3 - Бактерии рода *Sinorhizobium* (Cronan G.E., Keating D.H., 2004)

Утилизируют маннитол и другие углеводы с образованием кислоты. На средах с углеводами наблюдается выделение внеклеточной слизи полисахаридной природы. Оксидазоположительны, образуют уреазу, не образуют индол (Ridley B.L., Jeyaretnam B.S., Carlson R.W., 2000).

1.4. Иммунодефициты и их коррекция

Иммунная система — сложная функциональная структура человеческого организма, которая должна, с одной стороны, поддерживать постоянство клеточного состава органов и тканей, а с другой — отражать агрессию проникших в организм патогенных факторов (Караулов А.В., 1999).

Иммунные реакции реализуются посредством двух тесно связанных между собой звеньев иммунитета — клеточного (Т- и В-лимфоциты, макрофаги и др.) и гуморального (иммуноглобулины). Для обмена информацией и координации действий иммунной системы лимфоциты вырабатывают белки-цитокины: интерфероны, интерлейкины и др. Количественная или функциональная недостаточность того или иного звена иммунной системы ведет к развитию иммунодефицитных состояний. Наиболее частыми клиническими проявлениями иммунодефицитов служат рецидивирующие,

затяжные, тяжело протекающие инфекции: бактериальные, вирусные, грибковые (Голощапова Е.Н., 1997).

В основном иммунодефициты связываются с характерными изменениями крови: нейтропении, эозинофилии, анемии, тромбоцитопении. Существует сочетание с другими пороками развития: гипоплазией клеточных элементов хрящей, волос, эктодермальной дисплазией, пороками сердца и крупных сосудов (Н.И. Ильина, Т.В.Латышева, Б.В. Пинегин, Н.У. Сетдикова, 2000).

С невысокой частотой встречаются первичные (врожденные) иммунодефициты. Они обусловлены мутациями специфических генов иммунного ответа. Вторичный иммунодефицит — клинко-иммунологический синдром, развивающийся на фоне ранее нормального функционирования иммунной системы. Он характеризуется устойчивым выраженным снижением количественных и функциональных показателей специфических и/или неспецифических факторов иммунорезистентности. Среди причин развития вторичного иммунодефицита следует указать: вирусные инфекции, особенно поражающие лимфоциты и макрофаги; некоторые бактериальные инфекции; ионизирующую радиацию; воздействие химических ядов и некоторых лекарств (цитостатики, циклоспорины, глюкокортикостероидные гормоны); протозойные и глистные инвазии; дефицит в организме белка, витаминов и микроэлементов; злокачественные новообразования, почечную недостаточность, сахарный диабет, большинство хронических заболеваний; алкоголизм, наркоманию, курение (Воробьев А.А., 2002).

Для восстановления функций иммунной системы используют лекарственные препараты — иммуномодуляторы. Иммунологический эффект иммуномодуляторов зависит от исходного состояния иммунитета пациента: эти лекарственные средства понижают повышенные и повышают пониженные показатели иммунитета. Свойствами иммуномодуляторов обладать соединения различной природы и химического строения: вещества микробного происхождения и их синтетические и полусинтетические аналоги; препараты

животного происхождения (экстракты из тимуса, костного мозга, селезенки и др.); цитокины (например, интерфероны) и препараты, стимулирующие их синтез в организме; средства растительного происхождения (на основе эхинацеи, женьшеня и др.). Получено также несколько синтетических соединений, оказывающих выраженное влияние на иммунную систему (азоксимера бромид, левамизол).

Вторичная иммунная недостаточность формируется у контингентов с исходно нормальной иммунной системой. У них могут поражаться Т-, В- и фагоцитарные звенья иммунитета, возможны их сочетания, что приводит к снижению количества, функции и взаимодействия лимфоцитов и фагоцитов (Zschiesche W., Semenov B.F., Denner J., 1987).

Клинические проявления иммунодефицитов характеризуются злокачественными новообразованиями, аллергическими и аутоиммунными заболеваниями. У больных часто формируется ревматоидный артрит, системная красная волчанка (СКВ), склеродермия, системные васкулиты, тиреоидит, рассеянный склероз, хроническая почечная недостаточность, сахарный диабет 1 типа (Muller F., Haung C.J., Froland S.S., 1995).

Иммунодефицитами обозначают устойчивые изменения иммунного статуса, обусловленные дефектами одного или нескольких механизмов иммунного ответа. Различают несколько вариантов иммунодефицитов: врожденные (первичные), возрастные (физиологические) - в раннем детстве, старческом возрасте, приобретенные (вторичные), инфекционные (вирус-индуцированные) (Zschiesche W., Semenov B.F., Denner J., 1987).

В основе первичных иммунодефицитов, или первичной иммунной недостаточности лежит генетически обусловленная неспособность организма реализовать какие-либо звенья иммунного ответа. Они проявляются на ранних этапах постнатального периода, наследуются по аутосомно-рецессивному типу (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Чередеев А.Н., 1998).

Приобретенные иммунодефициты формируются под действием окружающей среды на уровне фенотипа, в то время как первичная иммунная недостаточность генетически обусловлена и проявляется на уровне генотипа. Не у всех первичных иммунодефицитов есть характерные маркеры, в ряде случаев приобретенная иммунная недостаточность индуцируется латентно протекающей вирусной инфекцией. В последнем случае трудно решить, обусловлен ли данный иммунодефицит генетически или он возникает в организме после рождения. Вторичные иммунодефициты встречаются гораздо чаще, чем первичные.

Вторичная иммунная недостаточность формируется у контингентов с исходно нормальной иммунной системой. У них могут поражаться Т-, В- и фагоцитарные звенья иммунитета, возможны их сочетания, что приводит к снижению количества, функции и взаимодействия лимфоцитов и фагоцитов (Zschiesche W., Semenov B.F., Denner J., 1987).

Клинические проявления иммунодефицитов характеризуются злокачественными новообразованиями, аллергическими и аутоиммунными заболеваниями. У больных часто формируется ревматоидный артрит, системная красная волчанка (СКВ), склеродермия, системные васкулиты, тиреоидит, рассеянный склероз, хроническая почечная недостаточность, сахарный диабет 1 типа (Muller F., Haung C.J., Froland S.S., 1995).

В основном иммунодефициты связываются с характерными изменениями крови: нейтропении, эозинофилии, анемии, тромбоцитопении. Существует сочетание с другими пороками развития: гипоплазией клеточных элементов хрящей, волос, эктодермальной дисплазией, пороками сердца и крупных сосудов (Н.И. Ильина, Т.В.Латышева, Б.В. Пинегин, Н.У. Сетдикова, 2000).

Иммуноглобулины играют ведущую роль в уничтожении бактерий и других инфекционных агентов. Они также способствуют реализации опсонизирующего эффекта.

Дефицит иммуноглобулинов проявляется рецидивирующими и хроническими бактериальными инфекциями, в том числе вызванными слабыми невирулентными возбудителями. Преимущественно поражаются органы дыхания (бронхоэктазы, фиброз легких), желудочно-кишечный тракт (с диареями, нарушенным всасыванием), придаточные пазухи носа, мозговые оболочки. Инфекции протекают с тяжелыми интоксикациями, часто осложняются септицемией (Стефани Д.В., Вельтщев Ю.Е., 1996).

Дефицит иммуноглобулинов может протекать в форме тотальной гипогаммаглобулинемии или в виде вариантов со снижением уровня одного класса или подкласса специфических белков (Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1997).

Дефициты клеточного иммунитета проявляются развитием инфекций с внутриклеточным паразитированием возбудителя (туберкулез, лепра, бруцеллез, вирусные инфекции, микозы). При менее грубых дефицитах клеточного иммунитета чаще развиваются персистирующие или рецидивирующие вирусные инфекции. Более грубые дефекты манифестируются микозами. Именно на иммунодефицитный фон наслаиваются такие инфекции, как туберкулез, бруцеллез (Першин Б.Б., 1994).

Дефицитом клеточного иммунитета объясняется развитие заболеваний, вызванных простейшими. При этом инвазии могут не отражаться существенно на состоянии больных (лямблиоз, трихомониаз) или наслаиваться только на выраженные дефициты клеточного иммунитета (токсоплазмоз, пневмоцистоз). Большинство простейших, гельминтов и прочих инвазирующих агентов сами обладают иммуносупрессорными влияниями (Покровский В.И., Гордиенко С.П., Литвинов В.И., 1994).

Под модуляцией (коррекцией) понимают стимуляцию заниженных и снижение завышенных значений показателей иммунного статуса. Реализуется четыре основных направления иммунокоррекции:

- коррекция гормонами и медиаторами иммунной системы (тимические факторы, миелопептиды, цитокины типа интерферона, факторов переноса, ИЛ, колониестимулирующих факторов, факторов взаимодействия лимфоцит-макрофаг и др.);
- иммунная инженерия (трансплантация органов и тканей иммунной системы: костный мозг, клетки эмбриональной печени, тимуса, комплекс тимус-грудина и т.д.), введение γ -глобулинов или иммуноглобулинов отдельных классов, плазмы крови);
- коррекция иммуностимуляторами естественного происхождения (вакцины, липополисахариды, бактериальные смеси, а также синтетические препараты - левамизол, диуцифон, полианионы, изоприназин и др.);
- использование лазерного и ультразвукового облучения, сорбционные методы, плазмаферез и др.

Список модуляторов иммунной системы в настоящее время превышает 200 наименований и продолжает увеличиваться. Общепринятой классификации иммуотропных средств пока нет (Манько В.М., Петров Р.В., Хаитов Р.М., 2002).

По происхождению иммунокорректоры могут быть из растительного, микробного, животного сырья, синтетические (Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Бабаянц А.А., 1996).

Требования к модуляторам: минимальная активность; не вызывать побочных действий (злокачественного перерождения клеток) и не потенцировать их свойств у других препаратов; не вызывать алергизации и индукции аутоиммунных реакций; легко метаболизироваться и выводиться из организма; совместимость с другими препаратами; предпочтительно пероральный способ введения, естественное происхождение, наличие иммуномодулирующих свойств (Караулов А.В., 1999).

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы исследований

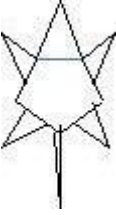
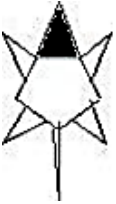
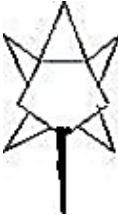
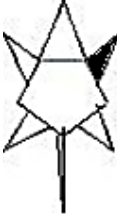
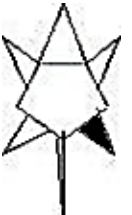
2.1.1. Лабораторные животные

Эксперимент проводился на белых беспородных мышах мужского пола массой 20-30г. Влияние фракций липополисахаридов изучалось после предварительной однократной инъекции цитостатика циклофосфана (50мг/кг) внутривентрально. Введение фракций липополисахаридов и вещества сравнения начиналось через 24 часа после вызывания иммунодефицита и далее ежедневно в течение 21 дня. На 21-е сутки проводился забор крови и внутренних органов.

Мыши были разбиты на группы и маркированы пикриновой кислотой в соответствии со следующей схемой (таблица 1).

Животных содержали в пластмассовых клетках на деревянных стружках (площадь клеток 1125 см²). Мыши получали стандартный корм и воду без ограничения, их содержали при температуре 20 – 25⁰ С и 65% влажности со сменой светового режима через 12 часов. Содержание животных, забор крови и органов проводили в соответствии с положением работы с животными, принятым в НИИЭМ, которое полностью соответствует аналогичным Положениям в России (МЗ РФ от 19 июня 2003 г. №267).

Таблица 1- Маркировка лабораторных животных в эксперименте

№ 1 ИНТАКТНЫЕ (через зонд ничего не вводится) <u>Кол-во: 10</u> 	№ 2 КОНТРОЛЬ (Введение воды) <u>Кол-во: 10</u> 	№ 3 ГР.СРАВН. (Ликопид – 0,1 мл) <u>Кол-во: 10</u> 	№ 4 ОПЫТ (ЛПС 7-10) <u>Кол-во: 10</u> 	№ 5 ОПЫТ (ЛПС-11-15) <u>Кол-во: 10</u> 
№ 6 ОПЫТ (ЛПС-16) <u>Кол-во: 10</u> 	№ 7 ОПЫТ (ЛПС-17) <u>Кол-во: 10</u> 			

2.1.2. Препарат создания модели иммунодефицита

Перед введением фракций липополисахаридов у лабораторных мышей был смоделирован иммунодефицит. Для этого внутрибрюшинно вводили цитостатик циклофосфан (циклофосфамид) в дозе 50 мг/кг. Далее ежедневно внутрибрюшинно вводили в соответствующих группах мышей водили фракции ЛПС в дозе 10 пг/мл. Через 3 недели проводили забор крови и органов лабораторных мышей для органометрии.

Циклофосфан относится к алкилирующим препаратам, которые из всех существующих противоопухолевых препаратов получили наиболее широкое применение (Блохин Н.Н., 1984). По химической структуре циклофосфан является циклическим фосфорилированным производным азотистого иприта. Согласно классификации ВОЗ, иприты относятся к агентам как смертельного действия, так и к инкапаситантам калечащего действия (Куцепко С.А., 2004).

Применение циклофосфана ограничено из-за ряда выраженных побочных эффектов. Токсическое влияние высоких доз ЦФ по экспериментальным данным выражается в ухудшении общего состояния животных, снижении массы и волосяного покрова, вялости и апатии, нарушении функции ЖКТ, угнетении гемопоэза, в частности лейко- и лимфопоэза (С. А. Гиллер, 1965).

Циклофосфан воздействует на лейкоциты на всех этапах созревания. Лейкоциты для продолжения дифференцировки должны репарировать возникшие двуцепочечные разрывы, которые появляются в результате остановки репликативной вилки, наталкивающейся на препятствие в виде сшивки цепей ДНК. Двухцепочечные разрывы нити ДНК хромосомы являются летальным повреждением, активирующим клеточные процессы, направленные на его репарацию.

При введении циклофосфана в токсических дозах были выявлены глубокие и стойкие изменения во всех ростках кроветворения мышей. Общее количество лейкоцитов снижается более чем наполовину в первые 5 дней, а к десятому дню - на 70-80%. Наиболее чувствителен к препарату лимфопоэз. Несущественны сдвиги со стороны эритропоэза и тромбоцитопоэза (Белоусова А.К., 1977). При введении большой разовой дозы лейкопения появляется через 7-14 дней и сохраняется 3-10 дней (Гершанович МЛ., 1982). По химической структуре циклофосфан является циклическим фосфорилированным производным азотистого иприта. Согласно классификации ВОЗ, иприты относятся к агентам как смертельного действия, так и к инкапаситантам калечащего действия (Куцепко С.А., 2004).

Механизм нарушений гемопоэза при применении циклофосана связан большей частью с тем, цитостатик индуцирует множественные двуцепочечные разрывы в ДНК кроветворных клеток. Это приводит к мутациям, хромосомным aberrациям и, в конечном итоге, к гибели клеток (Попова Н. А., 2006).

Циклофосфан воздействует на лейкоциты на всех этапах созревания. Лейкоциты для продолжения дифференцировки должны репарировать возникшие двуцепочечные разрывы, которые появляются в результате остановки репликативной вилки, наталкивающейся на препятствие в виде сшивки цепей ДНК. Двухцепочечные разрывы нити ДНК хромосомы являются летальным повреждением, активирующим клеточные процессы, направленные на его репарацию.

После того, как клетка опознает повреждение, активируется система передачи сигнала, состоящая из нескольких трансдуцирующих киназ. Сигнальные киназы запускают каскад молекулярных событий, определяющих арест клеточного цикла и активацию репаративных систем. В конечном счете, включается система репаративной гомологичной рекомбинации, которая использует для репарации донорные последовательности сестринской хроматиды или гомологичной хромосомы. Однако при наличии множественных повреждений, вызванных цитостатиком, возникают стерические препятствия для протекания процесса рекомбинации или сказывается недостаток репаративных комплексов, осуществляющих репарацию, и клетка оказывается неспособной устранить возникшие повреждения и вступает в апоптоз (Николин В. П., Попова Н. А., Себелева Т. Е., 2006).

Применение циклофосфана ограничено из-за ряда выраженных побочных эффектов. Токсическое влияние высоких доз ЦФ по экспериментальным данным выражается в ухудшении общего состояния животных, снижении массы и волосяного покрова, вялости и апатии, нарушении функции ЖКТ, угнетении гемопоэза, в частности лейко- и лимфопоэза (С. А. Гиллер, 1965).

2.1.3. Препарат группы сравнения

В качестве контрольного препарата сравнения иммуномодулирующей активности использовали ликопид, являющийся синтетическим аналогом бактериальных гликопептидов и относящийся к фармакотерапевтической группе - иммуномодуляторы.

Вещество ликопида – глюкозаминил-мурамил-дипептид представляет собой основную структурную единицу пептидогликана клеточной стенки бактерий. Воздействует на клетки врождённой иммунной системы, связываясь со специфическим рецептором. Вызывает стимуляцию эффекторных функций фагоцитов (освобождение активных форм кислорода, лизосомальных ферментов, презентация антигенов) и продукцию провоспалительных цитокинов, в свою очередь, индуцирующих пролиферацию, активацию и дифференцировку клеток приобретённого иммунитета — Т- и В-лимфоцитов. Через усиление продукции колониестимулирующих факторов. В результате действия препарата происходит активация всех звеньев иммунной системы с усилением противоинфекционного и противоопухолевого иммунитета. После перорального введения быстро всасывается. Максимальная концентрация в плазме неизменного ГМДП выявляется через 4 часа. Доступность составляет около 77 %. Полностью метаболизируется через 8 часов. Продукты метаболизма обнаруживаются в кровотоке в течение 12 часов и выводятся, главным образом, через почки с мочой. По степени воздействия на организм Глюкозаминилмурамилдипептид относится к малоопасным веществам (4 класс опасности). Препарат не обладает тератогенным и мутагенным эффектом. Не оказывает местно раздражающего и сенсибилизирующего действия.

Биологическая активность препарата обусловлена наличием специфических центров связывания (рецепторов) к ГМДП, локализованных в эндоплазме фагоцитов и Т- лимфоцитов. Препарат стимулирует функциональную (бактерицидную, цитотоксическую) активность фагоцитов (нейтрофилов,

макрофагов), усиливает пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, повышает синтез специфических антител. Фармакологическое действие осуществляется посредством усиления выработки интерлейкинов (интерлейкина-1, интерлейкина-6, интерлейкина-12), фактора некроза опухолей-альфа, гамма-интерферона, колониестимулирующих факторов. Препарат повышает активность естественных киллерных клеток (Першин Б.Б., 1994).

Препарат применяется у взрослых и детей для комплексной терапии состояний, сопровождающихся вторичными иммунодефицитами.

При химиотерапии ликопид принимают по 10-20 мг 1 раз в сутки в течение 10 дней. То есть – $0,14-0,28 \text{ мг/кг}$ при весе 70 кг.

Расчет для мышей при дозировке $0,17 \text{ мг/кг}$:

1. Средний вес мыши 30 г. Необходимо $30 \cdot 0,17 / 1000 = 0,005 \text{ мг}$.
2. Для этого таблетку 1 мг развели в 20 раз ($0,05 \text{ мг}$ в 1 мл).
3. Вводили мышам по 0,1 мл свежеприготовленного раствора ($0,005 \text{ мг}$).

2.1.4. Фракции липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*

Фракции липополисахарида *Sinorhizobium meliloti* (ЛПС-7-10, ЛПС-11-15, ЛПС-16, ЛПС-17), *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* были получены и любезно предоставлены для исследований с.н.с., к.б.н. Гарафутдиновым Р.Р. (зав. лабораторией физико-химических методов исследования биополимеров ФГБУН ИБГ УНЦ РАН).

2.2. Методы исследований

2.2.1. Расчет органомерических характеристик органов

Орган может рассматриваться как многоуровневая иерархическая система, в

которой между всеми морфологическими уровнями имеются строгие структурно-функциональные взаимоотношения. Результаты органомерического исследования необходимы для установления общих параметров всех его структурно-функциональных элементов (Юшков Б.Г., Черешнев В.А., 2016).

Органомерический анализ имеет два аспекта. Данные органомерического исследования могут быть использованы для определения общей картины наблюдаемого явления. Кроме того, органомерический анализ является этапом полного системного исследования, когда устанавливаются морфологические соотношения между структурно-функциональными компонентами одного уровня исследования с последующим определением межуровневых связей.

Массовый коэффициент (МК) - процентное отношение массы органа к массе тела, интегральный показатель, используемый в токсикологии для оценки состояния внутренних органов.

Таблица 2 - Весовые индексы органов белых лабораторных мышей

(Юшков Б.Г., Черешнев В.А., 2016)

Вид животных	Селезенка (г)	Печень (г)	Почки (г)	Сердце (г)
Мышь белая	0,152±0,0031	0,360±0,114	0,33±0,021	0,12±0,0007

Органы, извлеченные при некропсии, взвешивают влажными, как можно скорее, после некропсии, чтобы избежать их высыхания, парные органы взвешивают вместе. Расчет массовых коэффициентов производят по формуле: $МК = \text{Масса органа (г)} / \text{масса тела (г)} * 100\%$.

Оценка доли той или иной структурной составляющей органа на макроскопическом уровне исследования с использованием метода взвешивания зарисовок дает ряд погрешностей случайного и систематического порядка, которые связаны с разной плотностью бумаги даже в одном листе, с

погрешностями в выполнении зарисовок, их вырезания и взвешивания. Эти ошибки плохо поддаются учету, вследствие чего трудно установить величину необходимых поправок. Метод линейного интегрирования, несмотря на свою простоту, не имеет четкого математического обоснования, а для применения требует специального оборудования.

Указанных недостатков лишен метод «полей». Он выводится из основных положений теории вероятностей и математической статистики, поэтому результаты всегда могут быть проконтролированы и доведены до нужной степени точности.

Для использования этого метода на практике нет нужды в каком-либо специальном оборудовании, а необходимые тестовые сетки с равномерно удаленными точками могут быть изготовлены самостоятельно. Метод полей эффективен и экономичен, при хорошем навыке на весь процесс исследования, включая и статистическую обработку материала, для одного случая обычно затрачивается не более 20 мин (Салтыков А.И., 1978). Только в тех случаях, когда доля анализируемой структурной составляющей органа очень низка, затраты времени возрастают.

Метод «полей» состоит в «замене» объема (поверхности) органа соответствующим числом точек пространственной или плоскостной решетки, с одновременной заменой объема данного структурного компонента соответствующим ему числом точек взвешенной в органе пространственной решетки, с последующей оценкой доли всех точек решетки, которые приходятся на данный структурный компонент. Метод полей эффективен и экономичен, при хорошем навыке на весь процесс исследования, включая и статистическую обработку материала, для одного случая обычно затрачивается не более 20 мин (Салтыков А.И., 1978).

Результаты органомерического исследования необходимы для установления общих параметров всех его структурно-функциональных элементов (Юшков Б.Г., Черешнев В.А., 2016).

Анализ на плоскостных препаратах проводят следующим образом. На поверхность органа накладывают сетку с решеткой, имеющей равноудаленные точки (рис. 12) и производят дифференцированный подсчет числа точек, приходящихся отдельно на каждую структурную составляющую органа. Получаемые цифровые показатели обрабатывают методами альтернативной статистики с расчетом дисперсии, среднего квадратического отклонения и ошибки. В случае, когда поставлена задача определения долевого вклада в величину плоского органа с очагами патологии, то такой очаг принимают за один из структурных составляющих органа и дифференцированно устанавливают число приходящихся на него точек.

Нужного числа подсчетов точек для получения достоверных данных в 95% доверительном интервале достигают либо увеличением плотности точек в решетке, уменьшая расстояния между ними, либо же повторными наложениями одной и той же решетки на объект исследования. Второму способу следует отдать предпочтение, особенно в тех случаях, когда увеличение плотности точек в планиметрической решетке грозит повышением нагрузки на зрительный аппарат со снижением производительности труда.

Анализ данного показателя при токсикологических исследованиях, дает возможность обнаружения органа-мишени токсиканта, выявить признаки эндокринно-связанных эффектов (Юшков Б.Г., Черешнев В.А., 2016).

2.2.2. Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили непараметрическими методами с применением современных программных пакетов математико-статистического анализа. Применяли программы: «Microsoft Excel» и «Statistica 10.0», работающие в операционной среде «Windows». Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для описания количественных признаков в малых выборках применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q_1-Q_3). Для расчета статистической значимости различия количественных признаков между группами был применен непараметрический критерий Манна-Уитни для двух независимых групп.

U-критерий Манна-Уитни – непараметрический статистический критерий, используемый для сравнения двух независимых выборок по уровню какого-либо признака, измеренного количественно. Метод основан на определении того, достаточно ли мала зона перекрещивающихся значений между двумя вариационными рядами (ранжированным рядом значений параметра в первой выборке и таким же во второй выборке). Чем меньше значение критерия, тем вероятнее, что различия между значениями параметра в выборках достоверны.

U-критерий подходит для сравнения малых выборок: в каждой из выборок должно быть не менее 3 значений признака. Допускается, чтобы в одной выборке было 2 значения, но во второй тогда должно быть не менее пяти.

Условием для применения U-критерия Манна-Уитни является отсутствие в сравниваемых группах совпадающих значений признака (все числа – разные) или очень малое число таких совпадений (Сидоренко Е. В., 2001).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti*

Результаты исследований органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti* представлены в таблице 3. Из данных таблицы видно, что селезенка иммунодефицитных мышей значительно увеличивалась под действием цитостатика (на 41%), что наблюдается и при применении некоторых изучаемых нами фракций ЛПС. Данное явление является результатом повышенной реактивности лимфо-макрофагальной системы животных при введении циклофосфана и не может рассматриваться как патология.

Значительная кардиомегалия при химиотерапии в группе мышей, не принимающих фракции липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti* (на 16%), свидетельствует о токсическом действии алкилирующего цитостатика, обусловленным декомпенсаторными процессами в системе кровообращения. В то же время, при применении ЛПС, таких процессов не выявлено, судя по органомерическим показателям сердца, что говорит о том, что под действием ЛПС снижается степень интоксикации у животных, и процессы компенсации преобладают в системе кровоснабжения.

Существенной разницы показателей метрии печени и почек, при введении фракций липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti*, выявлено не было. Из этого факта, можно сделать заключение, что исследуемые ЛПС не обладают гепатотоксичными и нефротоксичными свойствами.

Таблица 3 - Результаты органомерических показателей на фоне применения фракций липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti*

Показатель	Группы мышей						
	1 (n=10)	2 (n=10)	3 (n=10)	4 (n=10)	5(n=10)	6(n=10)	7(n=10)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-7-10	ЛПС-11- 15	ЛПС-16	ЛПС-17
	Селезенка						
M±σ	0,178±0,04	0,252±0,04	0,228±0,07	0,194±0,06	0,288±0,1	0,164±0,06	0,276±0,06
Me	0,18	0,28	0,27	0,18	0,27	0,15	0,25
[Q1-Q3]	[0,135- 0,165]	[0,205- 0,25]	[0,155- 0,215]	[0,135- 0,16]	[0,205- 0,26]	[0,125- 0,145]	[0,24-0,25] P ₂₋₇ =0,75
		P₁₋₂=0,047	P ₂₋₃ =0,4	P ₂₋₄ =0,076	P ₂₋₅ =0,75	P ₂₋₆ =0,028	
	Сердце						
M±σ	0,184±0,05	0,214±0,04	0,196±0,05	0,178±0,04	0,154±0,04	0,148±0,02	0,142±0,02
Me	0,18	0,19	0,18	0,18	0,15	0,14	0,15
[Q1-Q3]	[0,14- 0,165]	[0,185- 0,19]	[0,155- 0,175]	[0,14-0,17] P ₂₋₄ =0,14	[0,12- 0,135]	[0,135- ,014]	[0,12- 0,135]
		P ₁₋₂ =0,754	P ₂₋₃ =0,251		P₂₋₅=0,047	P₂₋₆=0,009	P₂₋₇=0,009
	Печень						
M±σ	1,574±0,18	1,42±0,29	1,48±0,22	1,444±0,2	1,958±0,38	1,196±0,27	1,404±0,19
Me	1,59	1,3	1,5	1,43	1,78	1,17	1,29
[Q1-Q3]	[1,425- 1,58]	[1,2-1,25] P ₁₋₂ =0,251	[0,265- 1,43] P ₂₋₃ =0,676	[1,28-1,36] P ₂₋₄ =0,602	[1,66- 1,765] P₂₋₅=0,047	[0,975- 1,18] P ₂₋₆ =0,175	[1,265- 1,285] P ₂₋₇ =0,875
	Почки						
M±σ	0,43±0,03	0,374±0,09	0,352±0,08	0,276±0,05	0,306±0,04	0,298±0,08	0,348±0,04
Me	0,44	0,37	0,37	0,26	0,33	0,27	0,36
[Q1-Q3]	[0,405- 0,435]	[0,285- 0,33] P ₁₋₂ =0,531	[0,265- 0,325] P ₂₋₃ =0,251	[0,24-0,25] P ₂₋₄ =0,06	[0,26- 0,295] P ₂₋₅ =0,175	[0,22-0,3] P ₂₋₆ =0,175	[0,315- 0,355] P ₂₋₇ =0,6

3.2. Анализ органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa*

Результаты исследований органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa* представлены в таблице 4. Из данных таблицы видно, что селезенка иммунодефицитных мышей значительно увеличивалась под действием цитостатика (на 40%), но под действием изучаемых ЛПС не увеличивается, что свидетельствует об угнетении реактивности лимфатико-макрофагальной системы.

Увеличение размеров сердца под действием химиотерапии в группе мышей, не принимающих фракции липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa*, свидетельствует о токсическом действии алкилирующего цитостатика, обусловленным декомпенсаторными процессами в системе кровообращения. В то же время, при применении ЛПС *Pseudomonas aeruginosa*, наблюдаются такие же явления декомпенсации сердечно-сосудистой системы.

Значительная гепатомегалия (в среднем на 60%) выявлена в группах мышей, подвергшихся лечению ЛПС *Pseudomonas aeruginosa*, что говорит об их токсическом действии. Кроме того, о токсичности и изучаемых ЛПС синегнойной палочки свидетельствуют результаты органомерии почек, проявляющиеся в уменьшении их размеров и веса, как результат дистрофических процессов.

Таким образом, применение ЛПС патогенных микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa*), является не обоснованным при цитостатической терапии, так как обладают выраженными гепатотоксичными и нефротоксичными свойствами, а также способностью угнетать систему иммунитета и кровообращения. Стоит сделать оговорку, что большинство из полученных результатов не показали статистическую достоверность по

критерию Манна-Уитни, и потому целесообразно продолжать изучение влияния ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* на иммунитет.

Таблица 4 - Результаты органомерических показателей на фоне применения фракций липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa*

Показатель	Группы мышей				
	1 (n=10)	2 (n=10)	3 (n=10)	4 (n=10)	5(n=10)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-13	ЛПС-17
Селезенка					
М±σ	0,16±0,07	0,22±0,07	0,12±0,04	0,15±0,05	0,16±0,07
Ме	0,15	0,2	0,12	0,15	0,16
[Q1-Q3]	[0,1-0,2]	[0,2-0,3]	[0,1-0,1]	[0,1-0,2]	[0,1-0,2]
		P ₁₋₂ =0,7	P ₂₋₃ =1	P ₂₋₄ =1	P ₂₋₅ =1
Сердце					
М±σ	0,1±0,01	0,11±0,03	0,11±0,03	0,12±0,04	0,11±0,03
Ме	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
[Q1-Q3]	[0,1-0,1]	[0,1-0,1]	[0,1-0,1]	[0,1-0,1]	[0,1-0,1]
		P ₁₋₂ =0,754	P ₂₋₃ =0,251	P ₂₋₄ =0,14	P₂₋₅=0,047
Печень					
М±σ	1,17±0,36	1,31±0,36	1,35±0,28	1,44±0,29	1,35±0,35
Ме	1,1	1,3	1,3	1,4	1,3
[Q1-Q3]	[1 -1,4]	[1,1-1,6]	[1,1-1,7]	[1,3-1,7]	[1,2-1,4]
		P ₁₋₂ =0,273	P ₂₋₃ =0,940	P ₂₋₄ =0,307	P ₂₋₅ =0,91
Почки					
М±σ	0,24±0,05	0,26±0,07	0,23±0,05	0,23±0,07	0,23±0,05
Ме	0,2	0,25	0,2	0,2	0,2
[Q1-Q3]	[0,2-0,3]	[0,2-0,3]	[0,2-0,3]	[0,2-0,3]	[0,2-0,3]
		P ₁₋₂ =0,597	P ₂₋₃ =0,385	P ₂₋₄ =0,31	P ₂₋₅ =0,385

3.3. Анализ органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов *Escherichia coli*

Результаты исследований органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов *Escherichia coli* представлены в таблице 5. Из данных таблицы видно, что селезенка иммунодефицитных мышей под действием изучаемых ЛПС не увеличивается, что свидетельствует об угнетении реактивности лимфатико-макрофагальной системы.

При применении ЛПС *Escherichia coli* не выявлено явлений кардиомегалии, судя по органомерическим показателям сердца, что говорит о том, что под действием изучаемых ЛПС степень интоксикации у животных не высокая, и процессы компенсации преобладают в системе кровоснабжения.

Существенной достоверной разницы показателей метрии печени и почек, при введении фракций липополисахаридов *Escherichia coli*, выявлено не было. Из этого факта, можно сделать заключение, что исследуемые ЛПС не обладают выраженными гепатотоксичными и нефротоксичными свойствами.

Таким образом, можно сделать вывод о некотором положительном влиянии изучаемых ЛПС при химиотерапии.

Таблица 5 - Результаты органомерических показателей на фоне применения фракций липополисахаридов *Escherichia coli*

Показатель	Группы мышей					
	1 (n=10)	2 (n=10)	3 (n=10)	4 (n=10)	5(n=10)	6(n=10)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3
	Селезенка					
M±σ Me [Q ₁ -Q ₃]	0,16±0,09 0,125 [0,07-0,25]	0,12±0,04 0,12 [0,09-0,14] p ₁₋₂ = 0,473	0,22±0,04 0,215 [0,19-0,24] P ₂₋₃ = 0,0002	0,12±0,04 0,115 [0,1-0,14] p ₂₋₄ = 0,821	0,12±0,04 0,115 [0,1-0,13] p ₂₋₅ = 0,910	0,16 ±0,09 0,17 [0,11-0,24] p ₂₋₆ = 0,186
	Печень					
M±σ Me [Q ₁ -Q ₃]	2,04±0,55 1,8 [1,6-2,27]	1,3±0,44 1,265 [0,95-1,65] p ₁₋₂ = 0,016	1,74±0,5 0,68 [0,26-1,2] p ₂₋₃ = 0,023	1,32±0,27 1,34 [1,28-1,38] p ₂₋₄ =0,678	1,5±1,16 1,45 [0,93-2,09] p ₂₋₅ =0,545	1,98 ±0,36 1,97 [1,83-2,29] p ₂₋₆ = 0,003
	Почки					
M±σ Me [Q ₁ -Q ₃]	0,4±0,1 0,405 [0,32-0,44]	0,32±0,04 0,31 [0,29-0,33] p ₁₋₂ = 0,038	0,38±0,15 0,35 [0,27-0,52] p ₂₋₃ = 0,705	0,36±0,05 0,375 [0,34-0,4] p ₂₋₄ = 0,031	0,36±0,05 0,34 [0,34-0,4] p ₂₋₅ = 0,028	0,38 ±0,08 0,355 [0,32-0,46] p ₂₋₆ = 0,059
	Сердце					
M±σ Me [Q ₁ -Q ₃]	0,16±0,05 0,17 [0,12-0,19]	0,12±0,04 0,115 [0,09-0,14] p ₁₋₂ = 0,028	0,16±0,05 0,175 [0,13-0,21] p ₂₋₃ = 0,059	0,12±0,04 0,11 [0,09-0,16] p ₂₋₄ = 0,91	0,14±0,05 0,14 [0,11-0,18] p ₂₋₅ = 0,257	0,16 ±0,05 0,175 [0,1-0,2] p ₂₋₆ = 0,38

3.4. Сравнительная характеристика органомерических исследований липополисахаридов

На рисунке 4 в виде диаграммы обобщены средние данные по органомерическим исследованиям липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*.

Из данных диаграммы видно, что селезенка иммунодефицитных мышей увеличивалась под действием цитостатика, что наиболее выражено при применении фракций ЛПС *Sinorhizobium meliloti*. Данное явление является результатом повышенной реактивности и активации лимфо-макрофагальной системы животных. В то же время при использовании ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* селезенка мало того, что не претерпевает значительных изменений, но и незначительно уменьшена по сравнению с органами интактных животных, что свидетельствует об угнетении иммунологической реактивности.

Кардиомегалия при химиотерапии в группе мышей, не принимающих фракции липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti* и в группе применения ликопида, свидетельствует о токсическом действии алкилирующего цитостатика, обусловленным декомпенсаторными процессами в системе кровообращения. В то же время, при применении ЛПС *Sinorhizobium meliloti*, таких процессов не выявлено, судя по органомерическим показателям сердца, что говорит о том, что под действием ЛПС снижается степень интоксикации у животных, и процессы компенсации преобладают в системе кровоснабжения. В то же время, при применении фракций ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* в среднем выявлено, что сердце меньше, чем в контрольной группе, что возможно связано с дистрофическими процессами в миокарде.

Существенной разницы показателей метрии печени и почек, по сравнению с контролем, при введении фракций липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti* и *Escherichia coli* выявлено не было. Из этого факта, можно сделать заключение,

что исследуемые ЛПС не обладают гепатотоксичными и нефротоксичными свойствами, в сравнении с этими органами групп, где применялись ЛПС *Pseudomonas aeruginosa*, что видимо тоже связано с происходящими в них дистрофическими процессами.

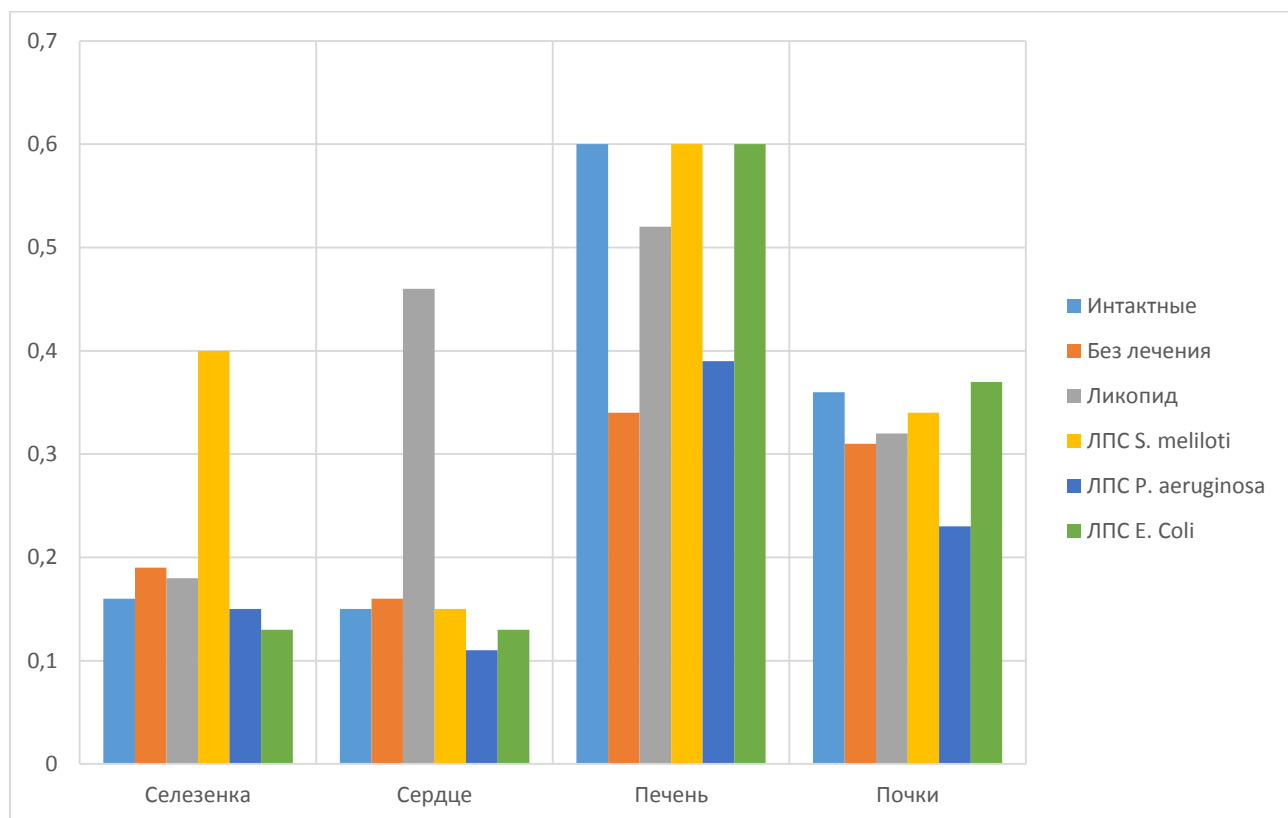


Рисунок 4 - Сравнительная характеристика средних значений органомерических исследований липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*

ВЫВОДЫ

В современной медицине широко используются разные иммуномодуляторы микробного происхождения. Эффективность этих препаратов установлена многими авторами, однако практически нет данных и исследований применения и эффективности ЛПС таких широко распространенных бактерий, как бактерии рода *Sinorhizobium*. Интерес к этому роду бактерий вызван тем, что ЛПС патогенных грамотрицательных микроорганизмов содержит токсичный для человека липид А, а бактерии рода *Sinorhizobium* не представляют никакой опасности для организма, так как являются широко распространенными почвенными симбионтами растений. В то же время фракции ЛПС этих бактерий с биохимической точки зрения должны обладать схожими иммуномодулирующими эффектами, что не исключает возможности их использования в качестве препаратов лечебно-диагностического назначения.

Проведенный обзор литературных источников показывает значение применения ЛПС микробного происхождения в качестве иммуномодуляторов, однако экспериментальное применение и сравнительная характеристика ЛПС бактерий рода *Sinorhizobium* практически не изучено, что определяет актуальность наших исследований.

Целью наших экспериментов явилось проведение сравнительной характеристики иммуномодулирующих свойств очищенных липополисахаридов бактерий рода *Sinorhizobium* в эксперименте на лабораторных животных. Для этого были поставлены и выполнены следующие задачи:

1. Охарактеризовать изменения органомерических характеристик мышей после применения фракций липополисахаридов бактерий рода *Sinorhizobium* на фоне иммунодефицита.

2. Изучить влияние фракций липополисахаридов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* на органомерические показатели иммунодефицитных мышей.

3. Провести сравнительную оценку влияния липополисахаридов бактерий *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* на органомерические характеристики мышей.

После проведенных сравнительных исследований иммуномодулирующих свойств очищенных липополисахаридов бактерий рода *Sinorhizobium* в эксперименте на лабораторных животных, можно сделать следующие выводы.

1. Результаты исследований органомерических характеристик органов на фоне иммунодефицита и применения фракций липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti* свидетельствуют о том, что исследуемые ЛПС активируют лимфо-макрофагальную систему и не обладают гепатотоксичными и нефротоксичными свойствами.

2. Применение ЛПС патогенных микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*), является не обоснованным при цитостатической терапии, так как обладают гепатотоксичными и нефротоксичными свойствами, а также способностью угнетать систему иммунитета и кровообращения. Меньшее токсическое действие выражено при использовании фракций ЛПС *Escherichia coli*.

3. Применение фракций липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti* при индуцированном иммунодефиците у мышей в сравнении с фракциями ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*, является более оправданным и безопасным, так как уменьшает выраженность угнетения иммунной системы и функций гепаторенальной системы по анализу органомерических характеристик.

В связи с использованием малых выборок экспериментальных животных и низкой статистической достоверности в некоторых группах по критерию Манна-Уитни, целесообразно продолжить дальнейшее всестороннее изучение

влияния различных фракций липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* на иммунную систему.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях Л. Медицина, 1962. -180 с.
2. Бартенева Н.С. Взаимосвязь химической структуры и биологической активности эндотоксина грамотрицательных бактерий // Молекулярная и клеточная регуляция инфекционного иммунитета: Сб. науч. тр. -М., 1985.-С. 62-71.
3. Белоусова А.К. Молекулярные механизмы действия алкилирующих агентов и антибиотиков / А.К.Белоусова // Химиотерапия злокачественных опухолей. - М: Медицина, 1977. - С.61-117.
4. Блохин Н.Н. Химиотерапия опухолевых заболеваний / Н.Н.Блохин, Н.И.Переводчикова. - М.: Медицина, 1984. - 304 с.
5. Воробьев А.А. Принципы классификации и стратегия применения иммуномодуляторов в медицине // Журн. микробиол. 2002. - № 4. -С. 93-98.
6. Гершанович МЛ. Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей / М.Л.Гершанович. - М.: Медицина, 1982. - 223с.
7. Голощапова Е.Н. Новые иммуномодуляторы с антибактериальной активностью // Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии. Труды 1-ой национальнойконференции РААКИ. М., 1997. - С. 458.
8. Гремякова Т.А., Фомченков В.М., Фурсова Н.К., Волковой К.И. Сравнительная характеристика физико-химических свойств липополисахаридов *Yersinia pestis* и R-мутантов энтеробактерий // Микробиология -1996. Т. 65, №6. - С.763 - 767.
9. Должко Д.В. Пиротерапия: патогенетическое обоснование использования липополисахаридов в медицине // Материалы VIII Международной студенческой электронной научной конференции «Студенческий научный форум», 2017

10. Затовская Т.В. Получение и анализ Tn5-мутантов *Sinorhizobium meliloti* с измененными поверхностными полисахаридами [Текст]: диссертация / Затовская Т.В., 2012
11. Земсков В.М., Земсков А.М. Принципы дифференцированной иммунокоррекции // Иммунология 1996 - № 3 - С. 4-6.
12. Иммунотерапевтические возможности применения ликопида у больных с вторичными иммунодефицитными состояниями / Б.В.Пинегин, А.М.Борисова, Н.В.Хоршилова и др. Методические рекомендации // М.: Минздрав РФ, 1996. 12 с.
13. Клиническая иммунология / Караулов А.В. (ред.) // М.: Медицинское информационное агенство, 1999 604 с.
14. Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Бабаянц А.А. Концепция иммунокоррекции при многофакторных иммунодефицитных состояниях, инфекционных и онкологических заболеваниях // Ж.микробиол.- 1996. N5. -С. 104-110.
15. Куценко С.А. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита: Учебник / С.А.Куценко, Н.В.Бутомо, А.Н.Гребенюк. - СПб.: Фолиант, 2004. - 528 с.
16. Лиходед В.Г., Ющук Н.Д., Яковлев М.Ю. Роль эндотоксина грамотрицательных бактерий в инфекционной и неинфекционной патологии. Архив патологии. 1996; 58(2): 8-13.
17. Мавзютов А.Р., Бондаренко К.Р., Еникеев А.Н., Бондаренко В.М. Системная эндотоксинемия как патогенетический фактор осложнения беременности. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012; 5: 16-21.
18. Манько В.М., Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуномодуляция: история, тенденции развития, современное состояние и перспективы // Иммунология. 2002. - N3. - С. 132-138.

19. Модели и подходы для изучения иммунитета при инфекциях/ Иммунология инфекционного процесса // Покровский В.И., Гордиенко С.П., Литвинов В.И. (ред.) М., 1994. - С. 29-39.
20. Набережных Г.А., Хоменко В.А., Красикова И.Н., Ким Н.Ю., Соловьева Т.Ф. Кооперативное взаимодействие между белком-порином и липополисахаридом. // Биоорган, химия. 1996. Т. 22, Вып. 9. С. 671-677 .
21. Николин В. П., Попова Н. А., Себелева Т. Е. и др. Влияние экзогенной ДНК на рост экспериментальных опухолей // Вопр. онкол. – 2006. – Т. 52. – №1. – С. 66-69.
22. Онищук О.П., Шарыпова Л.А. Курчак О.Н. и др. Выявление генов *Sinorhizobium meliloti*, влияющих на синтез поверхностных полисахаридов и конкурентоспособность // Генетика. 2005. Т. 41. С. 1617-1623.
23. Першин Б.Б. Стресс, вторичные иммунодефициты и заболеваемость.- М., 1994.-190 с.
24. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунодиагностика иммунодефицитов // Иммунология. 1997. -N4. С.7-9.
25. Попова Н. А. и др. Влияние экзогенной ДНК на восстановление лейкопоза и противоопухолевый эффект циклофосфана // Вопросы онкологии. - 2006.-N 3.-С.336-340.
26. Ронин В.С. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований учеб. пособие для фельдшерско-лаборантских отделений /В.С.Ронин, Г.М. Старобинец. - М.: Медицина. -1989.
27. Сепиашвили Р.И. Иммунотропные препараты: классификация, проблемы и перспективы // Аллергол. Иммунол. 2001 - № 1 С. 39-45.
28. Сибиряк С.В., Алехин Е.К. Иммунотропные свойства липополисахаридов грамотрицательных бактерий // Антибиотики и химиотер. - 1988. -т.33, №11. С. 871 - 877.

29. Синдром вторичной иммунной недостаточности (протоколы диагностики и лечения) / Н.И. Ильина, Т.В.Латышева, Б.В. Пинегин, Н.У. Сетдикова // Иммунология 2000 - № 5 - С. 4-7.
30. Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. Липополисахарид-белковые комплексы внешней мембраны грамотрицательных бактерий // Биоорг. Химия. 1983. Т.9. С. 725-733.
31. Стефани Д.В., Вельтщев Ю.Е., Клиническая иммунология и иммунопатология детского возраста. Руководство для врачей.-М.: Медицина, 1996. 384 с.
32. Федореева Л.И., Соловьева Т.Ф., Оводов ЮС. Выделение и физико-химическая характеристика белка, входящего в состав эндотоксина из *Yersinia pseudotuberculosis*.И Биоорган, химия. 1989. Т.15, №6. С.737-745.
33. Федоров С.Н., Симаров Б.В. Получение мутантов *Rhizobium meliloti* с измененными симбиотическими свойствами под действием УФ-излучения//С.-х. биология. 1987, №9. С. 44-49.
34. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунодиагностика и иммунотерапия нарушений иммунной системы // Практикующий врач — 1997 № 9. — С. 5-13.
35. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Оценка иммунного статуса человека в норме и при патологии // Иммунология 2001 - № 4 - С. 4-6.
36. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Чередеев А.Н. Оценка иммунной системы человека: современное состояние вопроса, сложности и достижения // Иммунология. 1998. - N.6. - С.8-10.
37. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Вторичные иммунодефициты: клиника, диагностика, лечение // Иммунология. 1999.- N1. - С. 14-17.
38. Хиггинс К. Анализ и расшифровка // перевод с англ. 2010: 61- 67.
39. Циклофопан. Сборник статей / под ред. С. А. Гиллера. - Рига: Зинатне, 1965.-270 с.
40. Albus U., Baier R., Hoist O., Puhler A., Niehaus K. Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by

Sinorhizobium meliloti lipopolysaccharides // *New Phytologist* 2001. V. 151. P. 597-606.

41. Aman P., Mc-Neil M., Franzen L.-E., Darvill A.G., Albersheim P. Structural elucidation, using HPLC-MS, of the acidic polysaccharide secreted by *Rhizobium meliloti* strain 1021 // *Carbohydr. Res.* 1981. V.95. P. 263-282.

42. Bahlawane C., McIntosh M., Krol E., Becker A. *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility // *MPMI*. 2008. V.21, N11. P. 1498- 1509.

43. Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacological Research*. 2013; 69(1): 87–113

44. Brandenburg K., Andra J., Müller M., Koch M.H.J., Garidelc P. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity // *Carbohydr. Res.* -2003. Vol. 338. - P. 2477 – 2489.

45. Brandenburg K., Jurgens G., Andra J., Lindner B., Koch M., Blume A., Garide P. Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins // *Eur.J. Biochem.* 2002. V. 269, N.23. P.5972-5981.

46. Carlson R.W., Kalembsa S., Turowski D., Pachori P., Noel K.D. Characterization of the lipopolysaccharides from *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development//!. *Bacteriol.* 1987. V. 169. P. 4923-4928.

47. Cronan G.E., Keating D.H. *Sinorhizobium meliloti* sulfotransferase that modifies lipopolysaccharides // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186, N13. P. 4168-4176.

48. Elsbach P., Weiss J. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide // *Immunobiology*. 1993. V.187. N.3, P.417-429.

49. Fomsgaard A. Antibodies to lipopolysaccharides: some diagnostic and protective aspects // *APMIS Suppl.* 1990. - Vol. 18. - P. 1 - 38.

50. Freudenberg M.A., Galanos C. Lipopolysaccharide macrophage interaction: the first step in the development of endotoxin shock // *Exp. Cell. Biol.* 1989. - Vol. 57, № 2. - C. 95 – 100.

51. Glazebrook J, Walker G.C. A novel exopolysaccharide can function in place of the Calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti* 11 Cell. 1989. V.56. P. 661-672.
52. Huang J.X., Azad M.A.K., Yuriev E., Baker M.A., Nation R.L., Li J., Cooper M.A., Velkov T. Molecular Characterization of Lipopolysaccharide Binding to Human α -1-Acid Glycoprotein. *Journal of Lipids*. 2012, Article ID 475153, doi:10.1155/2012/475153
53. Keating D.H., Willits M.G., Long S.R. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in cell surface sulfation // *J. Bacteriol.* 2002. V.184. P. 6681-6689.
54. Lugtenberg B., Van Alphen L. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria // *Biochim. Biophys. Acta*. 1983. V. 737, N 1. P.51-115.
55. Marketon M.M., Gronquist M.R., Eberhard A., González J.E. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel N-acyl homoserin lactones // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184, N 20. P. 5686-5695.
56. Muller F., Haung C.J., Froland S.S. New immunopathogenetic aspects of infectious diseases // *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 1995. - Vol. 115, N 26. -P. 3259-3262.
57. Novotny A. M., Thomas S., Duron O.S., Relation of structure to function in bacterial O-antigens. 1/ Isolation methods // *J. Bacteriol.* 1963. V. 85, N. 2. P.418-426.
58. Putnoky P., Petrovics G., Kereszt A., Grosskopf E., Ha D.T.C., Banfalvi Z., Kondorosi A. *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in plant-bacterium interaction // *J. Bacteriol.* 1990. V. 172. P. 5450-5458.
59. Raetz C.R.H., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // *Annu. Rev. Biochem.* 2002. V. 71. P.635-700.
60. Ridley B.L., Jeyaretnam B.S., Carlson R.W. The type and yield of lipopolysaccharide from symbiotically deficient *Rhizobium* lipopolysaccharide

mutants vary depending on the extraction method // *Glicobiology*. 2000. V. 10. P. 1013-1023.

61. Zschiesche W., Semenov B.F., Denner J. Stimulation and suppression of immune responsiveness by viruses // *Immune Modulation by Infectious Agents* / Zschiesche W. (ed.) Jena: VEB Gustav Fischer Verlag. - 1987. -P. 114-201.

ОТЗЫВ

научного руководителя на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса медико-профилактического факультета с отделением микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, обучавшегося по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология» (профиль микробиология)

Мугинова Рафаэля Ирековича

на тему «Экспериментальная оценка иммуномодулирующей активности липополисахаридов бактерии рода *Sinorhizobium*».

Студент Мугинов Р.И. выполнял научно-квалификационную работу на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии Башкирского государственного медицинского университета. Его работа посвящена сравнительной характеристике иммуномодулирующих свойств очищенных липополисахаридов бактерий рода *Sinorhizobium* в эксперименте на лабораторных животных.

В ходе выполнения дипломной работы Мугинов Р.И. проработал достаточный объем отечественной и зарубежной научной литературы по данной теме и успешно овладел основными микробиологическими методами исследования, а также освоил технику работы с лабораторными животными. В процессе подготовки и написания работы он освоил все основные методы и приобрел необходимые навыки научно-исследовательской работы, проявил себя как исследователь.

Мугинов Р.И. является соавтором 1 статьи в сборнике материалов 82-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа-2017).

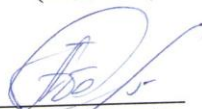
Выпускная квалификационная работа Мугинова Р.И. выполнена, завершена и рекомендуется к защите.

Научный руководитель:
д.м.н., профессор


(подпись)

А.Р. Мавзютов

Научный консультант:
стажер-исследователь


(подпись)

А.Р. Габдрахманова

 Июня 2017 г.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса медико-профилактического факультета с отделением микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ, обучавшегося по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология»

Мугинова Рафаэля Ирековича

на тему «Экспериментальная оценка иммуномодулирующей активности липополисахаридов бактерии рода *Sinorhizobium*».

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Экспериментальная оценка иммуномодулирующей активности липополисахаридов бактерии рода *Sinorhizobium*».

Оформление работы полностью соответствует принятым стандартам и соответствует традиционной схеме. В первой главе дипломной работы автором достаточно подробно представлена классификация иммуномодуляторов, которые используются в лечении различных заболеваний. Подробно охарактеризованы структура липополисахаридов и их иммунобиологические свойства, а также строение бактериальной клетки, в частности бактерий рода *Sinorhizobium*.

Вторая глава посвящена описанию материала и методов, использованных в ходе эксперимента. Автор провел сравнительную характеристику влияния фракций липополисахаридов *E.coli*, *Sinorhizobium meliloty* и *Ps.aeruginosa* на весовые характеристики паренхиматозных органов (печень, почки, селезенка) и сердца лабораторных мышей.

В третьей главе приводятся результаты исследования, проведена их статистическая обработка и подведены общие итоги проведенной работы. Выводы обоснованы и имеют практическую ценность.

В целом дипломная работа Мугинова Р.И. написана грамотно, продемонстрирован достаточный уровень теоретической подготовки, является завершенной, соответствует предъявляемым требованиям, может быть допущена к защите и заслуживает положительной оценки.

д.б.н., профессор кафедры
биологической химии
ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России

Князева

О.А. Князева

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса медико-профилактического факультета с отделением микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ, обучавшегося по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология»

Мугинова Рафаэля Ирековича

на тему «Экспериментальная оценка иммуномодулирующей активности липополисахаридов бактерии рода *Sinorhizobium*».

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Экспериментальная оценка иммуномодулирующей активности липополисахаридов бактерии рода *Sinorhizobium*».

Тема достаточно хорошо раскрыта с обобщением отечественного и зарубежного опыта и изложением собственной позиции.

Работа включает такие разделы, как введение, литературный обзор, описание материалов и методов исследований, представление собственных результатов и их обсуждения, заключение, выводы, список использованной литературы, приложения. В работе показана актуальность, имеется научная новизна и практическая значимость результатов эксперимента.

В главах, посвященных результатам исследования, подробно изложены основные этапы проведенной работы. Сформулированные выводы автора обоснованы, достоверны и могут быть использованы в практической деятельности. Материал работы логически структурирован, написан научным стилем.

Дипломная работа Мугинова Р.И. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к выпускным квалификационным работам, может быть рекомендована к защите и заслуживает положительной оценки.

Заведующий лабораторией
физико-химических методов
анализа биополимеров
ИБГ УНЦ РАН, к.б.н.

Р.Р. Гарафутдинов



УВАЖАЕМЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ!

Обращаем ваше внимание, что система «Антиплагиат» отвечает на вопрос, является ли тот или иной фрагмент текста заимствованным или нет. Ответ на вопрос, является ли заимствованный фрагмент именно плагиатом, а не законной цитатой, система оставляет на ваше усмотрение. Данный отчет не подлежит использованию в коммерческих целях.

Отчет о проверке на заимствования №1

Дата выгрузки: 28.06.2017 11:46:02

Автор: Кобзева Наталья Рудольфовна nrkob@mail.ru / ID: 5Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна (nrkob@mail.ru / ID: 5)

Организация: Башкирский государственный медицинский университет

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgmu.antiplagiat.ru>**ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ**

№ документа: 1920

Имя исходного файла: Мугинов Р.И.

Размер текста: 279 кБ

Символов в тексте: 33814

Слов в тексте: 3691

Число предложений: 221

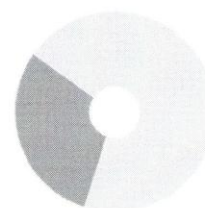
ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Отчет от 28.06.2017 11:46:04 - Последний готовый отчет (ред.)

Комментарии: не указано

Модули поиска:

ЗАИМСТВОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
29.72%	0%	70.28%



№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте
[01]	11.59%	11.59%	Основы органомерии	http://knowledge.allbest.ru	16 Апр 2012	Модуль поиска Интернет	8	8
[02]	0%	11.59%	Основы органомерии	http://z44et.net.ru	24 Ноя 2012	Модуль поиска Интернет	0	8
[03]	3.42%	3.56%	Минаева, Любовь Валерьевна диссерт..	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	12	14
[04]	3.39%	3.39%	Глюкозаминилмурамилдипептид	http://ru.wikipedia.org	01 Дек 2014	Модуль поиска Интернет	9	9
[05]	1.15%	2.57%	Соотношение уровня перфекционизм..	не указано	21 Июн 2015	Кольцо вузов	1	3
[06]	2.27%	2.27%	Липолипид ~ " - Официальная инструкци..	http://medi.ru	25 Ноя 2014	Модуль поиска Интернет	2	2
[07]	0%	1.89%	Диплом - Влияние личностных хар-к и...	не указано	18 Ноя 2015	Кольцо вузов	0	5
[08]	1.15%	1.78%	ВКР.rar(Ахунова(Шияева).docx	не указано	28 Дек 2015	Кольцо вузов	2	4
[09]	0%	1.47%	Иванов_Этап_5_Прохождение_нормо...	не указано	14 Ноя 2016	Кольцо вузов	0	6
[10]	0%	1.47%	Харисова_Этап_5_Прохождение_норм..	не указано	16 Июл 2015	Кольцо вузов	0	6
[11]	0%	1.46%	ГавриловаОВ_психология_бэ_2016г	не указано	15 Июн 2016	Кольцо вузов	0	6
[12]	0%	1.45%	TPU_VKR_22520.pdf	http://portal.tpu.ru	31 Мая 2016	Кольцо вузов	0	2
[13]	1.28%	1.43%	DiBase.ru :: Механизмы влияния эфирн...	http://dibase.ru	29 Сен 2016	Модуль поиска Интернет	5	6
[14]	0%	1.42%	НовичковаМА_психология_м_2016г	не указано	16 Июн 2016	Кольцо вузов	0	2
[15]	0%	1.42%	15-16 КР Соколова Е.Г. ЮПД 3.2 рук. Чир.	не указано	15 Июн 2016	Кольцо вузов	0	2
[16]	0.48%	1.42%	диплом белая.doc	не указано	16 Июн 2015	Кольцо вузов	1	2
[17]	0%	1.42%	p_3441_755.pdf	не указано	10 Апр 2017	Кольцо вузов	0	2
[18]	0%	1.39%	Кляусова, Елена Геннадьевна диссертат..	http://dlib.rsl.ru	25 Дек 2015	Коллекция диссертаций РГБ	0	8
[19]	0%	1.35%	Алиева.docx	не указано	15 Июн 2016	Кольцо вузов	0	2
[20]	0%	1.35%	ВКР_Конева	не указано	08 Июн 2016	Кольцо вузов	0	3
[21]	0%	1.33%	Аношко_ВКР_1660с.docx	не указано	11 Фев 2017	Кольцо вузов	0	4
[22]	0%	1.33%	БУБЕЛО_ВКР_1660с.docx	не указано	11 Фев 2017	Кольцо вузов	0	2
[23]	0%	1.26%	U-критерий Манна — Уитни	http://ru.wikipedia.org	12 Апр 2013	Модуль поиска Интернет	0	5
[24]	0%	1.26%	клиническая.docx	не указано	16 Апр 2016	Кольцо вузов	0	5
[25]	0%	1.25%	p_3501_403.pdf	не указано	10 Апр 2017	Кольцо вузов	0	2

[40]	0%	1.24%	ОНОУ	http://easlib.ru	02 Мар 2016	"Лань"	0	3
[27]	1.23%	1.23%	Ильичева, Екатерина Юрьевна диссер...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	3	3
[28]	0%	1.23%	ОСНОВЫ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБО...	не указано	22 Фев 2017	Модуль поиска ЭБС "Юрайт"	0	3
[29]	0%	1.22%	Медведева, Ольга Анатольевна диссер...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	1
[30]	0%	1.06%	disserA	не указано	07 Фев 2013	Модуль поиска "БГМУ"	0	4
[31]	0%	1.06%	Загитов, Артур Раусович диссертация ...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	4
[32]	0%	1.06%	disserA	не указано	07 Фев 2013	Кольцо вузов	0	4
[33]	0.09%	0.97%	диссертация	не указано	25 Янв 2013	Кольцо вузов	1	4
[34]	0%	0.91%	Гайсина, Эльза Шамильевна диссертаци...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	4
[35]	0.85%	0.85%	Изучение механизма взаимодействия...	http://lib.ua-ru.net	раньше 2011	Модуль поиска Интернет	2	2
[36]	0%	0.82%	Диплом Антиплагиат Бородатов.docx	не указано	14 Янв 2017	Кольцо вузов	0	2
[37]	0%	0.79%	диссертация	не указано	25 Янв 2013	Модуль поиска "БГМУ"	0	3
[38]	0.35%	0.68%	не указано	http://basmu.ru	30 Янв 2015	Модуль поиска Интернет	1	2
[39]	0.14%	0.56%	Глушков, Сергей Иванович диссертаци...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	4
[40]	0.51%	0.51%	213507	http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	3	3
[41]	0%	0.5%	213429	http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	3
[42]	0%	0.44%	ДиссерЛ	не указано	08 Фев 2013	Модуль поиска "БГМУ"	0	2
[43]	0.37%	0.37%	213490	http://e.lanbook.com	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Лань"	1	1
[44]	0.34%	0.34%	УЧАСТИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК В МОЛЕКУ...	http://bionet.nsc.ru	20 Окт 2014	Модуль поиска Интернет	3	3
[45]	0.33%	0.33%	Молекулярные и клеточные механиз...	http://disland.com	22 Сен 2016	Модуль поиска Интернет	1	1
[46]	0%	0.3%	Фундаментальные исследования. № 7...	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"	0	1
[47]	0%	0.3%	231086	http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	2
[48]	0.22%	0.29%	Онопrienko, Наталья Николаевна дис...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	1	1
[49]	0%	0.29%	Кашуро, Вадим Анатольевич диссертаци...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	1
[50]	0.28%	0.28%	Скачать материалы конференции (.pdf)	http://medic.pnzgu.ru	23 Окт 2012	Модуль поиска Интернет	2	2
[51]	0%	0.27%	Сборник научных работ конференции	http://reaviz.ru	27 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет	0	1
[52]	0.26%	0.26%	Дьяченко, Евгений Николаевич диссер...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	1	1
[53]	0%	0.22%	Вестник новых медицинских технолог...	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"	0	2
[54]	0%	0.22%	115959	http://biblioclub.ru	14 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	2
[55]	0%	0.21%	209193	http://biblioclub.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	2
[56]	0%	0.21%	Ерофеева, Людмила Михайловна Гипе...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	1
[57]	0%	0.21%	Ахматова, Нэлли Кимовна диссертация...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	1
[58]	0%	0.19%	Методы сбора и обработки маркетинг...	http://bibliorossica.com	27 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"	0	2
[59]	0%	0.19%	Методы сбора и обработки маркетинг...	http://ibooks.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"	0	2
[60]	0%	0.19%	Психология – наука будущего. Матери...	http://ibooks.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"	0	1
[61]	0%	0.19%	43184	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	1
[62]	0%	0.18%	221584	http://biblioclub.ru	18 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	1