

ISSN 0372-9011

ЖУРНАЛ

МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ
И
ИММУНОБИОЛОГИИ

1 2019

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY



4 602607 000085

УЧРЕДИТЕЛИ:
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
ЭПИДЕМИОЛОГОВ, МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. В. ЗВЕРЕВ, д.б.н., проф., акад. РАН

В.Г.АКИМКИН, д.м.н., проф., акад. РАН; Н.И.БРИКО, д.м.н., проф., акад. РАН;
О.В.БУХАРИН, д.м.н., проф., акад. РАН; А.Л.ГИНЦБУРГ, д.м.н., проф., акад.
РАН; А.В.КАРАУЛОВ, д.м.н., проф., акад. РАН; М.П.КОСТИНОВ, д.м.н., проф.;
В.В.КУТЫРЕВ, д.м.н., проф., акад. РАН; В.В.МАЛЕЕВ, д.м.н., проф., акад. РАН;
М.И.МИХАЙЛОВ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; Г.Г.ОНИЩЕНКО, д.м.н., проф.,
акад. РАН; А.Е. ПЛАТОНОВ, д.б.н., проф.; В.И.ПОКРОВСКИЙ, д.м.н., проф., акад.
РАН; О.А.СВИТИЧ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; Р.И.СЕПИАШВИЛИ, д.м.н., проф.,
член-корр. РАН; В.П.СЕРГИЕВ, д.м.н., проф., акад. РАН; Арег А.ТОТОЛЯН, д.м.н.,
проф., акад. РАН; Н.Н.ФИЛАТОВ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; С.В.ЧЕРКАСОВ,
д.м.н., проф., член-корр. РАН; Н.Д.ЮЩУК, д.м.н., проф., акад. РАН

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

1

январь—февраль

МОСКВА 2019

ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

БРУСИНА Е.Б. (Кемерово), ЗУЕВА Л.П. (Санкт-Петербург), КОРОЛЮК А.М. (Санкт-Петербург), МАМЕДОВ М.К. (Баку), ПРИСАКАРЬ В.И. (Кишинев), ТИТОВ Л.П. (Минск), ШАРКОВА В. (Владивосток), ШЕНДЕРОВ Б.А. (Москва), ШКАРИН В.В. (Н. Новгород)

Адрес редакции:

105064, Москва, М. Казенный пер., 5А, НИИВС им. И.И.Мечникова.

Статьи посылать: mech.inst@mail.ru

Зав. редакцией Л.В.Иваничева

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.
Свидетельство ПИ № ФС77-36745

Вниманию авторов!

Доподписка на I полугодие 2019 г. будет проходить
ТОЛЬКО по Объединенному каталогу «Пресса России»

Журнал индексируется в Scopus, РИНЦ,
входит в перечень ВАК, является органом ВНОЭМП

Формат 70x108 1/16. Печать офсетная.

Отпечатано в ООО «Буки Веди»
115093, г. Москва, Партийный переулок,
д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11
Тел.: (495)926-63-96
www.bukivedi.com
E-mail: info@bukivedi.com

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2019

К 100-ЛЕТИЮ НИИ ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Л.П.Блинкова, В.В.Зверев, О.А.Свитич, Н.Н.Филатов, В.В.Митрофанов

К 100-ЛЕТИЮ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ НИИ ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 3—10

Создание Института им. И.И. Мечникова связано с эпидобстановкой, сложившейся в России после 1 Мировой войны и Октябрьских событий 1917 г. Высокая заболеваемость и смертность из-за множественных вспышек тифов, дифтерии, скарлатины, холеры и оспы требовали от нового правительства срочных мер. В 1918 г. 1 Всероссийский съезд Медико-санитарных отделов Военно-революционного Комитета принял Постановление об организации Центрального института для изготовления прививочных и лечебных препаратов, а также для изучения клиники и эпидемиологии заразных болезней. Организацию учреждения поручили председателю Моссовета Льву Каменеву, который затем передал ответственное дело Московскому городскому отделу здравоохранения во главе с В.А. Обухом. Коллегия Мосгорздравотдела на основе материалов специальной Оргкомиссии, в которую входили Л.А. Тарасевич, П.Н. Диатроптов, Е.Н. Марциновский, Л.С. Розенталь, А.И. Абрикосов, вынесла Решение от 10(23) февраля 1919 г. учредить Городской бактериологический институт им. И.И. Мечникова Мосгорздрава. Впоследствии Институт неоднократно менял названия. С 1921 г. он стал Институтом инфекционных болезней им. И.И. Мечникова, с 1953 г. — Московским институтом вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Минздрава СССР. В 1982 г. название было изменено на Центральный НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Минздрава СССР, а в 1988 г. — на НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова АМН СССР. Это название в дальнейшем осталось за Институтом, менялась только ведомственная подчиненность.

Формирование Института поручили специалисту по инфекционным болезням, приват-доценту 1 МГУ Л.С. Розенталю. По его инициативе, Институт (вначале — бактериологическая лаборатория) разместили в 3 комнатах морга больницы им. Л.И. Тимистера в Лепехинском тупике. В штате было 3 врача: Л.С. Розенталь, В.А. Новосельский и О.Г. Биргер. Затем включили врача-зоолога Г.В. Эпштейна для исследования вшей и малярии, 2 лаборантов (И.П. Дедову и Л.И. Страхову), а также студента-практиканта П.П. Движкова. Через полгода Институт переехал в здание Новиченковской богадельни по ул. Покровка, 44. С 1920 г. директором Института вместо уехавшего в эмиграцию Л.С. Розенталя стал доктор В.А. Новосельский. В том же году в структуру Института вошло сывороточно-вакцинное отделение в Дмитровском уезде в хозяйстве Хлыбы. Кроме того, в 1921 г. Институту подчинили Пастеровскую станцию, созданную в июле 1886 г. с постройкой в 1889 г. нового корпуса, расположенного на территории Александровской больницы, а также больницу им. Ф.П. Гааза как экспериментально-клиническое отделение. Однако больница им. Ф.П. Гааза в 1924 г. была выведена из структуры Института. В 1922 г. сывороточно-вакцинное отделение завершило переезд в предоставленное бывшее имение князя А.В. Голицына в Петрово-Дальнем. В этот же период в Институте организовали отделение научных работ по инфекционным болезням и учебное отделение с

курсами для врачей по бактериологии, эпидемиологии, профилактике болезней, гигиене. Главврач Пастеровской станции А.В. Жуковский одновременно являлся заведующим этими курсами. Ежегодно курсы оканчивали 100 врачей, в том числе с периферии. После смерти в 1924 г. А.В. Жуковского Пастеровскую станцию возглавил рабиолог А.И. Саватеев, издавший в 1927 г. ценную до настоящего времени монографию по бешенству. Начали функционировать эпидемиологическое (зав. О.Г. Биргер) и протозоологическое отделения (зав. Г.В. Эпштейн), которые занимались малярией. Загородное сывороточно-вакцинное отделение, которым руководил В.А. Новосельский, стало ведущим в Институте. Там изготавливали вакцины и сыворотки для борьбы с наиболее распространенными инфекциями.

В 1923 г. Институт возглавил С.В. Коршун — талантливый организатор, специалист по вакцинам и сывороткам, ученик И.И. Мечникова, П. Эрлиха, А. Вассермана. С.В. Коршун расширил научные и производственные площади и сформировал эффективно работавший коллектив Института из опытных профессионалов. Среди них Л.С. Штерн, А.И. Саватеев, В.А. Сура, В.А. Крестовникова, А.И. Гороховникова, В.А. Башенин, М.Д. Утенков, А.М. Чельный, Н.Н. Вериго, П.Ф. Беликов, Ф.Г. Бернгоф, Н.А. Яблоков, М.П. Вагнер-Сахарова, В.Л. Ольшевская, Е.М. Ряхина, Л.П. Делягина, Ю.А. Дубовикова и много других. В этот период в Институте выпускали большое количество препаратов, необходимых для потребностей здравоохранения: сыпнотифозную и брюшнотифозную вакцины, паратифозные вакцины А и В, холерную, гонококковую, стафилококковую, стрептококковую, менингококковую, оспенную, туберкулезную БЦЖ вакцину, оспенный детрит, аутовакцины, а также несколько видов сывороток (антикоревую, антистрептококковую, антименингококковую, антидезинтерийную, противодифтерийную, нормальную лошадиную). С 1929 г. сывороточно-вакцинное отделение стало производить противогангренозные сыворотки. Востребованными были качественные референс-препараты (токсины Шика и Дика и др.), агглютинирующие сыворотки, диагностикумы, туберкулин, лактин для протеинотерапии, мечниковская простокваша, питательные среды.

На регулярные конференции (каждые 2 недели) по актуальным вопросам здравоохранения в институт приезжали ученые и врачи, высшее медицинское руководство, военные. Эти научные конференции в помещении института часто проходили как заседания Бактериологического отделения «Общества любителей естествознания», позднее «Московского микробиологического общества».

С 1924 г. С.В. Коршун начал в Институте издательскую деятельность, периодически публикуя итоговые отчеты в «Трудах Мечниковского института». Он был одним из редакторов «Журнала микробиологии, патологии и инфекционных болезней», руководил изданием журнала «Гигиена и эпидемиология», был членом редколлегии «Лабораторная практика» и «Московского медицинского журнала». Кроме этого, С.В. Коршун с 1928 г. являлся соредактором первых 15 томов первого издания Большой медицинской энциклопедии. Институт до 90-х годов издавал сборник «Вакцины и сыворотки», а затем другие тематические сборники, принимал активное участие в работе «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунологии». Главными редакторами журнала были в разное время академик Б.Ф. Семенов, а в настоящее время академик В.В. Зверев. Ответственными секретарями и научными редакторами в разные годы работали сотрудники Института Л.А. Шварцман, В.В. Сергеев, Р.М. Темпер и др. В 1930 г. С.В. Коршун был необоснованно арестован и расстрелян. В заключении также оказались еще 17 мечниковцев. Все они были реабилитированы в 1959 г.

При новой администрации Института произошла смена руководства на предприятии. Загородное отделение возглавил Е.Ф. Гогин, а сывороточно-вакцинное отделение — В.А. Влашевский. Сформировали микробиологический отдел с микробиологической, биохимической, гистологической лабораториями и другие подразделения. С 1932 г. под руководством зам. директора Л.А. Зильбера в Институте начались исследования по вирусным инфекциям на базе лаборатории фильтрующих вирусов, что способствовало образованию в 1935 г. Центральной вирусной

лаборатории страны, сотрудниками которой стали Л.И. Фалькович, А.К. Шубладзе, Е.Н. Левкович, Е.И. Туревич, Е.Ф. Янушевич, О.С. Коршунова, Е.М. Доссер. Через 2 года в Дальневосточной экспедиции, которой руководил Л.А. Зильбер, был открыт вирус-возбудитель весенне-летнего клещевого энцефалита.

Созданный к началу Великой Отечественной войны научно-производственный потенциал Института сыграл существенную роль в обеспечении войск и гражданского населения медицинскими препаратами (к этому времени выпускались 83 наименования препаратов). Осенью 1941 г., когда фашисты были в 8 км от предприятия в Петрово-Дальнем, Моссовет принял решение о вывозе на Восток специалистов, оборудования, лошадей-продуцентов. В чрезвычайных условиях были сформированы две производственные базы (в Уфе и под городом Чкаловом). Уже в ноябре Институт смог начать выпуск необходимых препаратов (вакцин, сывороток, бактериофагов, диагностических средств). Весной 1942 г. оба производства были запущены полностью. Институт существенно увеличил поставку раневых бактериофагов и противостолбнячных сывороток. Вновь начали производить сыпнотифозную вакцину. Кроме этого, в 1942 г. начали выпуск новой поликомпонентной сорбированной вакцины НИИСИ — против брюшного тифа, паратифов А и В, дизентерии Флекснера и Шига, холеры и столбняка (авторы Н.И. Александров и Н.Е. Гёфен). Снабжение препаратами многих госпиталей шло напрямую. Институт оставался главной базой Санитарного отдела оборонной зоны. За бесперебойное снабжение армии и флота качественными препаратами Министерство обороны неоднократно благодарило Институт. Помимо войсковых частей эпидемиологи Института обслуживали также Москву и Московскую область. Особенные заслуги в период войны принадлежат Л.П. Музыченко, В.А. Крестовниковой, А.И. Белкиной, С.П. Заевой, И.Ф. Персу, И.А. Пояркову, В.А. Кудрявцеву и многим другим. В военный период в Институте не прекращались научные исследования. По отчетным сведениям, за 1940-1945 гг. было опубликовано 283 работы и подготовлено 17 диссертаций, из них 2 докторские. Документально известно, что из ушедших на фронт мечниковцев погибли 49 человек.

После войны в Институте продолжились работы по созданию препаратов для профилактики, терапии и диагностики различных заболеваний. В 1951 г. снова был организован вирусологический отдел (В.Д. Соловьев, О.Г. Анджапаридзе) и продолжились исследования по оспе (С.С. Маренникова и др.), лептоспирозу (А.А. Варфоломеева и др.), бешенству (М.А. Селимов, Г.Д. Кобринский и др.). Отдел стал основой Института вирусных препаратов им. О.Г. Анджапаридзе. В Петрово-Дальнем были построены новые производственные корпуса. Там в 1970 — 80-х годах выпускали как прежний АКДС вакцина, брюшнотифозная вакцина, гамма-глобулин, сыворотки и др.), так и обновленный перечень медицинской продукции: специфические гамма-глобулины (М.Н. Янишевская и др.), питательные среды из непищевого сырья (Б.М. Раскин, В.М. Мельникова, С.В. Денисова и др.), диагностические аллергены (А.Х. Канчурин, М.Э. Капитонова, В.М. Бержец и др.), колибактерин (Е.А. Ильницкая и др.), диагностические сыворотки (Н.А. Хоменко, И.В. Голубева, В.П. Рагинская, А.П. Батуро, Ю.А. Ратинер и др.), лечебный препарат «Томицид» (Л.П. Блинкова, В.В. Сергеев, Л.Г. Бутова, С.И. Елкина, Н.М. Ландсман, В.К. Голдшмид и др.). В 1988 г. предприятие стало самостоятельным — ЗАО «Биомед им. И.И. Мечникова», а Институт вошел в систему АМН СССР.

С 1961 по 1967 г. старшим научным сотрудником Института был В.П. Эфроимсон, генетик, специалист с мировым именем, принадлежавший к школе Н.К. Кольцова и С.С. Четверикова. В 1964 г. вышло первое издание его книги «Введение в медицинскую генетику». В это время его учеником был впоследствии авторитетный иммунолог О.В. Рохлин, который выполнил под его руководством пионерскую работу по генетике иммунного ответа «Роль генотипа в образовании антител». В разное время в Институте работали известные академики: Л.В. Громашевский, Л.А. Зильбер, Л.С. Штерн, И.В. Давыдовский, В.Д. Соловьев, А.К. Шубладзе, О.Г. Анджапаридзе, Б.Ф. Семенов.

За годы работы Институт вырастил не только знаменитых ученых, но и создал в стране крупные научно-производственные структуры: кафедру микробиологии в

ЦИУ в 1932 г., Центральную вирусную лабораторию СССР в 1935 г., Уфимский ИВС им. И.И. Мечникова в 1941 г., Московский НИИ препаратов против полиомиелита (впоследствии — Московский НИИ вирусных препаратов) в 1957 г., укомплектованный кадрами эпидотдел — основу Центрального института эпидемиологии, микробиологии в 1963 г., Медико-инженерный центр иммунопрофилактики и предприятие «Биомед им. И.И. Мечникова» в 1988 г. и др.

В 1965-1968 годах пост директора занимал И.Ф. Михайлов, награжденный за работу в институте орденом Ленина. С 1974 по 2005 г. директором был профессор, академик АМН СССР, Б. Ф. Семенов, имя которого в мировой науке связано с работами по врожденному и приобретенному иммунитету к вирусным и бактериальным инфекциям и вакцинологии. Этот период деятельности Института оказался одним из наиболее ярких в истории учреждения. Долгие годы Б.Ф. Семенов был председателем Правления «Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» (ученый секретарь — Н.Н. Янова). В 2006 г. после объединения с Институтом вирусных препаратов им.О.Г. Анджaparидзе Институт возглавил академик РАН В.В. Зверев, ставший 12 директором. С октября 2018 г. директором Института стала член-корр. РАН Свитич О.А.

В последние десятилетия в Институте выполнялись исследования по вопросам специфической профилактики (М.П. Костинов и др.); иммунитета, включая врожденный и адаптивный (Б.Ф. Семенов, Л.М. Краснопрошина, Н.Б. Егорова, Е.А. Курбатова, Н.К. Ахматова, В.В. Свиридов, И.Б. Семенова и др.); генетики (В.Г. Лиходед, Л.П. Блинкова, Л.П. Семенова, Т.Б. Падалко, Ю.Д. Толчеев и др.) и физиологии микроорганизмов с разработкой передовых методов культивирования (Л.Г. Жданова, И.Ф. Перс, И.А. Баснакьян, И.М. Грубер, Г.М. Машилова и др.), биотехнологии (Н.В. Цветкова, Н.П. Ванеева, Л.Н. Падюков, А.А. Харитонов, И.Э. Семина и др.), а также разрабатывались новые безопасные методы применения вакцин, например, для детей с хронической патологией (М.П. Костинов и др.) или для непарентерального и энтерального (А.Н. Мешалова, Л.И. Краснопрошина, Н.С. Захарова, В.В. Сергеев, С.И. Елкина и др.), аэрозольного и безыгольного способа применения (Н.Б. Егорова, Л.С. Крейнин, Л.П. Блинкова, Ю.П. Вартамян, М.Я. Волынский, К.Г. Каверина, И.В. Мирошниченко, М.К. Северцева и др.). Сотрудники института осуществляли постоянный мониторинг эффективности вакцинации против кори, эпидемического паротита, краснухи (С.С. Унанов, Н.В. Юминова и др.). На основании полученных результатов была составлена и реализована Программа элиминации кори и снижения заболеваемости эпидемическим паротитом, а также врожденной краснухой в нашей стране.

В разные периоды в Институте были созданы, внедрены или готовятся к внедрению в медицинскую практику: инактивированная вакцина против полиомиелита (О.Г. Анджaparидзе, В.Д. Соловьев и др.); дермальная живая и инактивированная оспенные вакцины (С.С. Маренникова, Н.Н. Мальцева, Э.М. Шелухина, Г.Р. Мацевич и др.); антирабическая вакцина (М.К. Каракумчан, М.С. Бектимирова, Э.Р. Пилле и др.); живая интраназальная и пероральная гриппозные вакцины (Ю.З. Гендон, С.Г. Маркушин, И.И. Аكوпова, А.И. Климов и др.); коревая вакцина, паротитная вакцина, ассоциированная паротитно-коревая вакцина (О.Г. Анджaparидзе, Н.М. Гордиенко, Н.Н. Богомоллова и др.); брюшнотифозная вакцина с секста- (три ботулинических, два гангренозных и один столбнячный компоненты) или тетра- (три ботулинических и один столбнячный компоненты) анатоксинами, предназначенная для чрезвычайных ситуаций и внедренная в практику в начале 70-х годов (Н.Е. Гефен, Н.Ф. Леонтьева, Л.П. Блинкова, Ю.П. Вартамян, М.И. Волынский, Л.С. Крейнин, Н.Б. Егорова, И.В. Мирошниченко, К.Г. Каверина, М.К. Северцева, Г.А. Чулий и др.); разрешенная для производства аэрозольная противочумная вакцина (Н.И. Александров, Н.Е. Гефен, Ю.П. Николаенко, Е.С. Лазарева, М.А. Гладус, Т.И. Фатхинурова и др.); созданная в те же годы экспериментальная аэрозольная живая гриппозная вакцина (Н.Е. Гефен, В.В. Квирикадзе, Н.А. Блумберг, Л.Н. Куборина и др.) и приборы для аэрозольной вакцинации РСП-1 и РПЖ

(С.Ф. Федяев, В.А. Беляков, Л.П. Блинкова); «Томицид», внедренный в 1985 г. — первый отечественный коммерческий антибактериальный, иммуностимулирующий препарат на основе бактериоцина и структурных компонентов лактококка для терапии стафило-стрептококковых инфекций (ангины, пиодермии), гнойных и ожоговых ран (Л.П. Блинкова, В.В. Сергеев, Л.Г. Бутова, С.И. Елкина и др.); не имеющий аналогов и подготовленный для внедрения вакцинный препарат «Пиоиммуноген» для борьбы с синегнойной инфекцией (Е.С. Станиславский, Л.С. Едвабная, И.Г. Зайднер, Т.А. Макаренкова и др.); лечебная протейная вакцина и антипротейная гипериммунная плазма против гнойно-септических инфекций, внедренные в конце 80-х годов (Л.С. Крейнин, К.Г. Каверина, Л.А. Левина, Е.В. Зайцева и др.); во многом опередившая свое время поликомпонентная терапевтическая вакцина «Иммуновак ВП-4», активирующая эффекторные механизмы врожденного и адаптивного иммунитета, эффективная при терапии хронических воспалительных заболеваний органов дыхания, аллергических заболеваний, герпес-вирусной инфекции и профилактике ОРЗ (Н.Б. Егорова, Е.А. Курбатова, И.М. Грубер, Н.К. Ахматова, И.Б. Семенова, Л.С. Черкасова и др.); стафилококковая вакцина (Н.Б. Егорова, И.М. Грубер, Е.А. Курбатова, О.М. Игнатова, Л.С. Черкасова и др.); иммунокорректирующие препараты «Аффинолейкин» и «Стафилолейкин» (А.Н. Мац, Н.П. Перепечкина и др.); ряд других внедренных препаратов — диагностических сывороток (Н.А. Хоменко, И.В. Голубева, В.П. Рагинская, Б.С. Киселева, А.П. Батуро, Ю.А. Ратинер, Э.Е. Романенко, И.Н. Улиско и др.); аллергенов и тест-систем для диагностики аллергических, инфекционных и соматических заболеваний (В.М. Бержец, В.Б. Гервасиева, А.Ю. Конищева, С.А. Мазурина, П.В. Самойликов, Е.В. Коренева, О.Ю. Емельянова, С.В. Хлгатын, С.А. Жирова, Н.В. Цветкова, Н.П. Ванеева, Н.Е. Ястребова, Н.С. Кузьмина, А.В. Зубков, Р.Г. Десяткова, Н.Н. Мальцева, В.А. Гольцов, Ф.Г. Нагиева, В.Ф. Лавров, С.Н. Кузин и др.).

В 1986 — 1991 гг. вирусологи Института сконструировали и внедрили в медицинскую практику первые отечественные тест-системы для скрининга и диагностики ВИЧ-инфекции, а также создали средства иммуноферментной диагностики вирусных гепатитов (С.С. Маренникова, И.З. Зайцев, В.В. Зверев, А.Ю. Звонарев, Л.Л. Суханова, Г.И. Алаторцева, Е.В. Карасева, В.А. Гольцов, А.А. Гринев, В.Н. Лопарев, В.М. Блинов, А.Э. Сазонов, А.В. Титаев и др.).

Разработаны технологии получения бесклеточной противокклюшной вакцины (Е.И. Шмелева, Т.Н. Ремова, Н.С. Захарова, Н.У. Мерцалова, М.В. Брицина, Н.Н. Озерепковская, И.Г. Бажанова, Е.М. Зайцев и др.). Создан приоритетный банк гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам инфекционной и неинфекционной природы (В.В. Свиридов, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Н.Г. Титова и др.). Использование генно-инженерных технологий позволило получить перспективные для конструирования вакцин гибридные штаммы, продуцирующие атоксичные формы токсина *Pseudomonas aeruginosa* (Н.А. Михайлова, А.А. Калашин и др.), а также вакцинные штаммы вируса гриппа (С.Г. Маркушин, Т.М. Цфасман, В.Ю. Кост, Р.Р. Минтаев и др.). Совместно с ООО «Биотехновация» были разработаны в 1990-2000 гг. и выпускаются этой фирмой модификации наиболее востребованных микробиологических питательных сред (Л.П. Блинкова, А.В. Пискунова, О.Н. Альбицкая и др.). К приоритетным направлениям исследований Института относится изучение теоретических основ массовой профилактики биотерроризма с применением неизвестного патогена. В настоящий период выполняются исследования по созданию следующих препаратов для включения в Национальный календарь профилактических прививок: отечественной пневмококковой вакцины, оптимизированной по составу циркулирующих на территории России серотипов возбудителя (Н.А. Михайлова, Е.А. Курбатова, Д.С. Воробьев, И.М. Грубер, Н.Б. Егорова, А.В. Поддубиков, Н.О. Вартанова и др.); вакцины для профилактики гемофильной инфекции (Н.Е. Ястребова, И.М. Грубер); вакцин живых культуральных против ветряной оспы и опоясывающего герпеса, комбинированной тетравалентной живой культуральной вакцины

для профилактики кори, эпидемического паротита, краснухи и ветряной оспы (ТЕТРА-КВЭПК) (Ф.Г. Нагиева, Е.П. Баркова, Н.В. Юминова и др.); генно-инженерной вакцины для иммунотерапии и иммунопрофилактики синегнойной инфекции (Н.А. Михайлова, А.А. Калашин и др.); генно-инженерной живой вакцины против актуальных штаммов вируса гриппа (С.Г. Маркушин и др.).

К важнейшим направлениям деятельности Института относится разработка принципиально новых методов мониторинга и диагностики инфекционных агентов, аллергических, эндокринных и аутоиммунных заболеваний с использованием новейших технологий и научных достижений. Создан набор реагентов «ОРВИ-Монитор», предназначенный для одномоментного выявления в клинических образцах нуклеиновых кислот 12 основных возбудителей респираторных вирусных инфекций человека (вирусов гриппа А и В, парагриппа 1, 2, 3, 4 типов, аденовирусов, бокавирусов, респираторно-синцитиального вируса, риновирусов, энтеровирусов, коронавируса) методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени (Е.Б. Файзулов, А.А. Никонова, С.А. Лободанов и др.).

Разрабатываются иммуноферментные тест-системы с применением диагностически значимых рекомбинантных антигенов для выявления антител к антигенам возбудителей гемотрансфузионных инфекций (Г.И. Алаторцева, Л.Н. Нестеренко, В.В. Доценко, Л.Н. Лухверчик, В.В. Зверев, О.В. Борисова, И.А. Амиантова и др.). Некоторые исследования посвящены проблеме адресной доставки лекарственных препаратов в клетку, а также разработке современных подходов к созданию противовирусных препаратов, в том числе на основе интерференции РНК и избирательного «выключения» гена-мишени (А.А. Никонова, А.А. Марова, Г.Г. Кривцов, Е.Б. Файзулов и др.). Успешно выполняется работа по получению рекомбинантных «гуманизированных» антител для создания терапевтических и профилактических иммуноглобулиновых препаратов. Они могут применяться при конструировании средств для неотложной пассивной иммунотерапии и профилактики инфекций, в том числе вызываемых возбудителями особо опасных инфекций, а также для разработки диагностических препаратов (А.С. Оксанич, А.А. Никонова, Т.Г. Самарцева и др.).

Комплексным исследованиям вирусных гепатитов с энтеральным механизмом передачи возбудителя (гепатит А и Е) посвящены исследования лаборатории вирусных гепатитов (М.И. Михайлов, К.К. Кюрегян, О.В. Исаева, Е.Ю. Малинникова и др.). Получены приоритетные данные по диагностике, эпидемиологии и профилактике этих инфекций. Одним из направлений деятельности Института являются исследования по мониторингу и изучению микопатогенов в различных биоценозах с целью выявления факторов риска развития аллергических и инфекционных бактериальных и грибковых заболеваний (Т.М. Желтикова-Вострокнутова, В.Г. Арзуманян, А.Б. Антропова, И.Г. Ахапкина и др.).

Мировое значение приобрели теоретические работы в области иммунологии, аллергологии и вирусологии (В.В. Зверев, Б.Ф. Семенов, Е.В. Сидорова, В.Г. Гервасиева, О.А. Свитич, С.Г. Маркушин, Е.Б. Файзулов, Г.И. Алаторцева, В.В. Свиридов, А.В. Сидоров, М.Н. Носик, Н.К. Ахматова, Ф.Г. Нагиева, И.А. Ленева, И.Н. Дьяков, М.А. Буркин, О.В. Борисова, Ю.И. Амму, А.А. Никонова и др.), исследования в области генетики бактериофагов (В.Н. Крылов, М.В. Буркальцева и др.), новые направления в медицинской микробиологии по выявлению особенностей образования и восстановления некультивируемых на обычных средах возбудителей инфекций, которые в такой скрытой форме представляют значительную опасность для человека (Л.П. Блинкова, Ю.Д. Пахомов и др.), а также изучение триггерных механизмов преобразования симбиотической микробиоты в оппортунистическую в связи с изменением активности эндогенных антимикробных пептидов макроорганизма (В.Г. Арзуманян и др.).

Успехи, достигнутые Институтом, определяются высоким профессионализмом кадрового состава, которым многие годы занимается зав. отделом кадров Е.В. Лукачева. Долгие годы финансы учреждения находятся в заботливых руках гл. бухгалтера О.Н. Щербаковой и ее коллектива, а инженерно-техническая служба — у В.И. Румянцева и др. В Институте с 35 бюджетными лабораториями и численностью

... 500 сотрудников работают: 1 академик РАН (В.В. Зверев), 3 члена-корреспондента РАН (О.А. Свитич, Н.Н. Филатов, М.И. Михайлов), 31 доктор и 91 кандидат наук. Алаторцева Г.И., Аммур Ю.И., Арзуманян В.Г., Ахматова Н.К., Бержец В.М., Блинкова Л.П., Борисова О.В., Буркин М.А., Гервасиева В.Б., Гольцов В.А., Грубер И.М., Дьяков И.Н., Желтикова-Вострокнутова Т.М., Жирова С.Н., Зайцев Е.М., Зверев А.В., Конаныхина С.Ю., Костинов М.П., Крылов В.Н., Кузьмина Н.С., Курбатова Е.А., Лавров В.Ф., Ленева И.А., Лотте В.Д., Маркушин С.Г., Михайлова Н.А., Нагиева Ф.Г., Никонова А.А., Носик М.Н., Осокина О.В., Оспельникова Т.П., Поддубиков А.В., Свиридов В.В., Сидоров А.В., Файзулов Е.Б., Фошина Е.П., Юминова Н.В., Ястребова Н.Е. и др.

Многие из них являются членами Ученых Советов в других учреждениях, имеют научные школы по вакцинопрофилактике, вакцинно-сывороточному делу, иммунологии, аллергологии, вирусологии, медицинской микробиологии, генетике микроорганизмов, биотехнологии. Работы ученых Института публикуются в авторитетных отечественных и зарубежных журналах, докладываются на отечественных и международных конференциях. Они являются авторами монографий, сборников, в том числе изданных за рубежом. Ученые Института часто приглашаются на Телевидение, а также в разные организации как специалисты-эксперты (в частности, ВОЗ) и оппоненты диссертаций.

История Института будет хранить имена многих выдающихся ученых, вклад которых в отечественную микробиологию, иммунологию, вирусологию, аллергологию, эпидемиологию, генетику, вакцинно-сывороточное дело является существенным: В.А. Барыкин, А.И. Саватеев, Г.В. Эпштейн, Ф.Г. Бернгоф, О.Г. Биргер, В.А. Крестовникова, А.И. Гороховникова, В.С. Калинин, С.И. Гинзбург-Калинина, В.А. Башенин, С.С. Маренникова, М.А. Селимов, А.А. Варфоломеева, С.П. Заева, М.П. Вагнер-Сахарова, А.К. Косова, В.И. Шанина-Вагина, М.М. Кадэн, В.П. Эфроимсон, Б.Ф. Семенов, С.С. Унанов, Ю.З. Гендон, Т.А. Бектемиров, А.К. Шубладзе, Е.А. Петросян, А.К. Варгина, Л.И. Фалькович, А.В. Каляев, Ф.Т. Гринбаум, Л.Б. Хейфец, Л.А. Левина, М.А. Фролова, Н.И. Александров, Н.Е. Гефен, И.Ф. Михайлов, И.В. Голубева, Н.А. Хоменко, В.П. Рагинская, В.Г. Лиходед, Р.М. Темпер, Е.С. Станиславский, Б.М. Раскин, Л.Г. Жданова, Л.И. Краснопрошина, М.В. Далин, И.А. Баснакьян, А.П. Батуро, Л.С. Крейнин, Ю.А. Ратинер, А.И. Мац, Б.С. Киселева и др.

Традицией Института с момента его образования является подготовка высококвалифицированных кадров (руководитель отдела аспирантуры С.Н. Жирова). В 1939 г. в Институте открыли аспирантуру, интернатуру и экстернатуру. С 1965 г. Институт получил право проводить защиту диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, с 1975 г. — докторских диссертаций. Почти два десятилетия его ученым секретарем является И.В. Яковлева (ранее в течение 30 лет — Н.Г. Кудрявцева).

Особое внимание руководство Института уделяет молодежи, которая постоянно ощущает внимание со стороны Совета молодых ученых (рук. Е.Б. Файзулов). Целенаправленная работа в лабораториях с проведением экспериментов, ежегодное участие в молодежных конференциях с устными докладами молодых ученых, включая студентов, которые начинают заниматься наукой с 3—4 курса учебных заведений, все это формирует будущую кадровую основу Института. Активную роль в деятельности Института более 30 лет играет Ученый секретарь Н.И. Андропова, а также отдел организации и планирования научной деятельности (рук. — Г.М. Назарова, затем В.А. Гольцов).

В Институте успешно функционирует консультативно-диагностический Центр, (рук. Конаныхина С.Ю.), внебюджетная Испытательная лаборатория (рук. Н.С. Кузьмина), ЦКП «Коллекция микроорганизмов» (рук. А.В. Поддубиков), отдел Инновационного развития (рук. О.В. Осокина).

Росту авторитета Института как ведущего учреждения по научным основам вакцинно-сывороточного дела способствовало его участие в Глобальной программе ВОЗ по ликвидации оспы в мире, в многостороннем взаимодействии со странами СЭВ, а также в Международных научных конференциях.

О признании достижений Института за последние годы свидетельствуют награды, премии и почетные звания сотрудников. Ордена: Орден Дружбы народов — Анджапаридзе О.Г., Орден Почета — Семенов Б.Ф., Орден Дружбы — Десяткова Р.Г., Международный почетный знак — орден «Бифуркационная игла» — присужден за активное участие в ликвидации оспы на земле (Анджапаридзе О.Г., Булк В.Ф., Маренникова С.С., Мальцева Н.Н., Шелухина Э.М.). Премии Совета Министров СССР: 1959 г. — за разработку и внедрение в практику полиомиелитной инактивированной вакцины (Анджапаридзе О.Г., Соловьев В.Д., Доссер Е.М. и др.), 1981 г. — за создание технологий рестриктирующих ферментов (Семенов Б.Ф., Цветкова Н.В., Жданова Л.Г., Грубер И.М., в составе авторского коллектива). Премии Правительства РФ: 1999 г. — «Разработка и организация производства новых высокоэффективных средств диагностики ВИЧ-инфекции и гепатитов А, В, С» (Зверев В.В., Гольцов В.А., Суханова Л.Л., в составе авторского коллектива); 2005 г. — «Разработка, научное обоснование и внедрение системы защиты населения РФ от новых биологических угроз» (Зверев В.В., Семенов Б.Ф., в составе авторского коллектива). Звания «Заслуженный деятель науки Российской Федерации» удостоены: Анджапаридзе О.Г., Семенов Б.Ф., Баснакьян И.А., Гендон Ю.З., Гервасиева В.Б., Егорова Н.Б., Костинов М.П., Маренникова С.С., Мацевич Г.Р.

Переходя 100-летний рубеж создания Института и сохраняя научные традиции, НИИВС им. И.И. Мечникова продолжает выполнять приоритетные фундаментальные и прикладные исследования, направленные на создание эффективных и безопасных иммунобиологических препаратов для профилактики, диагностики и иммунотерапии инфекционных и аллергических заболеваний.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Г.И.Алаторцева¹, А.В.Сидоров¹, Л.Н.Нестеренко¹, Л.Н.Лухверчик¹, В.В.Доценко¹, И.И.Амиантова¹, М.В.Жукина¹, В.Ю.Кабаргина¹, А.В.Милованова¹, Д.С.Воробьев¹, Ю.И.Амму¹, М.И.Михайлов^{1,2}, К.К.Кюрегян^{1,2}, Е.Ю.Малинникова^{1,2}, С.В.Жаворонок³, В.М.Блинов¹, В.В.Зверев⁴

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА КАПСИДА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е ТРЕТЬЕГО ГЕНОТИПА: КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА, ОЦЕНКА АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²Российская медицинская академия последиplomного образования, Москва; ³Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь, ⁴Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Цель. Разработка рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита Е (ВГЕ) 3 генотипа и исследование его антигенных свойств. **Материалы и методы.** Штаммы E.coli, плазмидные векторы, серологический и клинический материал, иммуоферментные тест-системы. Молекулярно-биологические, биоинформационные, биотехнологические, биохимические и серологические методы. **Результаты.** С использованием вирусосодержащего материала от свиней из Белгородской области РФ получен рекомбинантный штамм E.coli — продуцент С-концевого фрагмента белка ORF2 в составе слитного с β-галактозидазой полипептида. Рекомбинантный белок выделен из телец-включений биомассы штамма-продуцента и очищен с помощью эксклюзионной хроматографии. Антигенная специфичность полученного рекомбинантного полипептида подтверждена в иммунохимических реакциях (ИФА, Вестерн-блоттинг) с образцами сывороток крови больных гепатитом Е и контрольных групп пациентов (здоровых доноров, больных гепатитами А, В, С, инфекционным мононуклеозом, цитомегаловирусной инфекцией и ВИЧ-инфицированных). **Заключение.** Разработан рекомбинантный антиген ORF2 ВГЕ 3 генотипа и показана возможность его применения в диагностических тестах.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 10—17

Ключевые слова: вирус гепатита Е 3 генотипа, ген orf2, капсидный белок, рекомбинантный антиген ORF2, иммуоферментный анализ, Вестерн-блоттинг

А.В. Сидоров¹, Л.Н. Нестеренко¹, Л.Н. Лухверчик¹, В.В. Дотсенко¹, И.И. Амiantова¹,
М.И. Заворотная¹, Г.А. Кабаргина¹, А.В. Милованова¹, Д.С. Воробев¹, Ю.И. Амму¹, М.И. Михайлов^{1,2},
Е.Ю. Малинникова^{1,2}, С.В. Заворонко³, В.М. Блин³, В.В. Зверев^{1,4}

DEVELOPMENT OF HEPATITIS E 3 GENOTYPE RECOMBINANT PROTEIN CAPSID OF: CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION, EVALUATION OF THE ANTIGENIC PROPERTIES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow; ³Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus; ⁴Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. The development of the hepatitis E virus (HEV) genotype 3 recombinant capsid protein. **Materials and methods.** *E.coli* strains, plasmid vectors, serological and clinical samples, ELISA reagent kits, molecular biological, bioinformatic, biotechnological, biochemical and serological methods. **Results.** Using virus-infecting material from pigs of Belgorod region (Russian Federation) we made *E.coli* strains producing recombinant capsid protein, containing C-terminal of viral ORF2 protein fragment fused to *E.coli* β -galactosidase. Recombinant protein ORF2 had been isolated from the bacterial inclusion bodies and purified by size exclusion chromatography. Antigenic specificity of the recombinant polypeptide was confirmed by ELISA and Western blotting with sera of hepatitis E patients and reference groups (healthy donors, patients with hepatitis A, B, C, infectious mononucleosis, cytomegalovirus infection and HIV-infected patients). **Conclusion.** HEV genotype 3 ORF2 recombinant antigen had been developed, and the possibility to use it in diagnostic tests had been experimentally shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 10—17

Key words: HEV genotype 3, orf2 gene, capsid protein, recombinant ORF3 antigen, ELISA, Western blot

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит Е (ГЕ) — острое вирусное инфекционное заболевание с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, реализуемым преимущественно водным путем, характеризуется острым течением и частым развитием тяжелых исходов (нередко летальных) у беременных. Источником инфекции являются больные с любой формой заболевания: как манифестной, так и субклинической безжелтушной. При бессимптомном течении ГЕ у домашних животных (свиней, крупного рогатого скота и др.) и птиц серологические и молекулярно-генетические маркеры ГЕ выявляются с частотой от 0,5 % до 70 %.

В РФ с 2013 г. регистрация случаев острого ГЕ включена в реестр официальной инфекционной заболеваемости страны. Однако в России, а также в странах Центрально-Азиатского региона бывшего СССР, где существуют стойкие очаги ГЕ, система серодиагностики ГЕ в широкую медицинскую практику не внедрена, что, вероятно, связано с отсутствием необходимых диагностических тест-систем, с одной стороны, и отсутствием эпидемиологической настороженности — с другой.

Лабораторное подтверждение ГЕ основывается на обнаружении РНК ВГЕ в фекалиях и/или сыворотке крови заболевших, а также выявлении IgM и/или нарастание титров IgG к ВГЕ в парных сыворотках крови в сочетании с клиническими и биохимическими проявлениями острого гепатита.

Тест-системы для выявления IgG и IgM к ВГЕ основаны на использовании рекомбинантных аналогов антигенов ВГЕ в методах непрямого и «ловушечного» ИФА. Наборы для определения IgG и IgM к ВГЕ широко различаются по показателям чувствительности (от 17 % до 100 %) и сходимости полученных с их применением результатов (от 49 % до 94 %) [7,11], что можно объяснить различиями в составе и структуре применяемых в них антигенов. Антигенные композиции всех имеющихся к настоящему времени тест-систем включают различные С-концевые фрагменты белка вирусного капсида (белка ORF2) ВГЕ, являющегося основным структурным компонентом вириона и мажорным антигеном вируса. Белок ORF2,

кодируемый геном *orf2*, содержит главные антигенные детерминанты вируса, отвечающие за индукцию протективного гуморального иммунного ответа организма-хозяина [9]. Полноразмерный капсидный белок ORF2 ВГЕ не используется в серологических тестах из-за высокой гидрофобности его отдельных участков и связанной с этим слабой растворимостью белка. В С-концевой области белка ORF2, по данным разных исследователей, в положении с 454 по 606 а.о. [10] или с 432 по 660 а.о. [12] локализованы основные иммунодоминантные домены, взаимодействующие со специфическими IgG и IgM у больных ГЕ и реконвалесцентов.

Фрагменты гена *orf2* были клонированы в различных векторных системах экспрессии, включая прокариоты, клетки насекомых и животных, трансгенные растения. Наряду с необходимостью получения рекомбинантных антигенов с наилучшими показателями диагностической эффективности важным является решение технологической задачи масштабирования производства целевого белка. Наиболее экономичным является использование прокариотических векторных систем экспрессии рекомбинантных антигенов в клетках *Escherichia coli*, к достоинствам которых относится дешевизна культивирования, простота выделения большого количества целевого продукта, непродолжительный производственный цикл. Однако существуют препятствия для достижения высоких показателей экспрессии белков в бактериальных клетках, связанные, например, с высоким содержанием GC-пар в клонируемом фрагменте ДНК. Одним из подходов к повышению продуктивности рекомбинантных штаммов *E.coli* является оптимизация кодирующей последовательности клонируемых фрагментов генома ВГЕ [13].

Заболевание у людей ассоциировано с четырьмя генотипами ВГЕ. На территории стран постсоветского пространства доминируют штаммы ВГЕ 1 и 3 генотипов: в Центральной Азии преобладает ВГЕ 1 генотипа, вызывающий заболевание исключительно у людей, ВГЕ 3 генотипа распространен повсеместно и является возбудителем антропозооноза. Примечательно, что с 3 генотипом ВГЕ связана спорадическая заболеваемость в низкоэндемичных регионах.

Белки ВГЕ разных генотипов антигенно различаются [6], что объясняет применение во многих диагностических тестах рекомбинантных антигенов, содержащих отдельные фрагменты белков ВГЕ разных генотипов или их комбинации [14]. Ранее мы сообщали о получении рекомбинантного антигена ORF2 ВГЕ 1 генотипа [2]. В настоящем исследовании была поставлена задача разработки рекомбинантного полипептида, содержащего антигенно значимый С-концевой фрагмент белка ORF2 ВГЕ 3 генотипа с использованием полученного в России вирусного изолята.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа и обработки нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайна праймеров использовали пакет программ VectorNTI ver.11.0. Полипептидные последовательности анализировали дополнительно, используя программу BLAST-Protein. Анализ коротких пептидных гомологий между белком ORF2 ВГЕ 3 генотипа и белками герпес-вирусов человека 1-8 типов проводили, используя ранее описанные алгоритмы [3]. Синтез фрагмента гена *orf2* ВГЕ 3 генотипа был выполнен компанией Евроген (Россия). Клонирование фрагментов ДНК в экспрессирующей векторной системе *pEL5a* [1] осуществляли по общепринятым методикам [5]. Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили методом Сэнгера в модификации капиллярного электрофореза в ЦКП ВНИИСБ «Биотехнология» на геномном анализаторе «ABI-3130-XL» («Applied Biosystems», США). Получение биомасс культур клеток *E.coli* PLT90, трансформированных векторной или рекомбинантными плазмидами, выделение и очистку рекомбинантных полипептидов проводили с помощью ранее опубликованных методик [4].

В работе использовали сыворотки крови больных ГЕ, предоставленные Белорусским государственным медицинским университетом (г. Минск). В качестве источника вирусной РНК использовали образцы фекалий свиней из свиноводческих хозяйств Белгородской обл. Сыворотки крови условно здоровых лиц и конт-

дельной группы, содержащие серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и инфекционных патологий печени иной этиологии (инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ-инфекция), были получены из МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского и Клинико-диагностического центра НИИВС им. И.И. Мечникова. В качестве положительного контрольного образца в иммунохимических реакциях использовали ранее полученный рекомбинантный полипептид ORF2 ВГЕ 1 генотипа [1], в качестве отрицательного — β -галактозидазу, полученную из клеток штамма *E.coli* PLT90, трансформированных векторной плазмидой pEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК. IgG к ВГЕ в образцах сывороток крови выявляли с помощью иммуноферментной тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы»). Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и возбудителями инфекционной патологии печени иной этиологии определяли с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HAV-G-РЕКОМБ», «ДС-ИФА-HBsAg-подтверждающий тест», «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ/АТ Скрин» (НПО «Диагностические системы», Россия), «Вектогеп В-HBs-антиген-2», «Гепабест анти-HBc-IgG», «Бест анти-ВГС-авто», «Бест анти-ВГС-подтверждающий тест», «Бест анти-ВГС-подтверждающий тест», «ВектоЦМВ-IgG-авидность», «ВектоВЭБ-ЕА-IgG», «ВектоВЭБ-NA-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), «БЛОТ ВИЧ S+0» (ЗАО БТК «Биосервис», Россия).

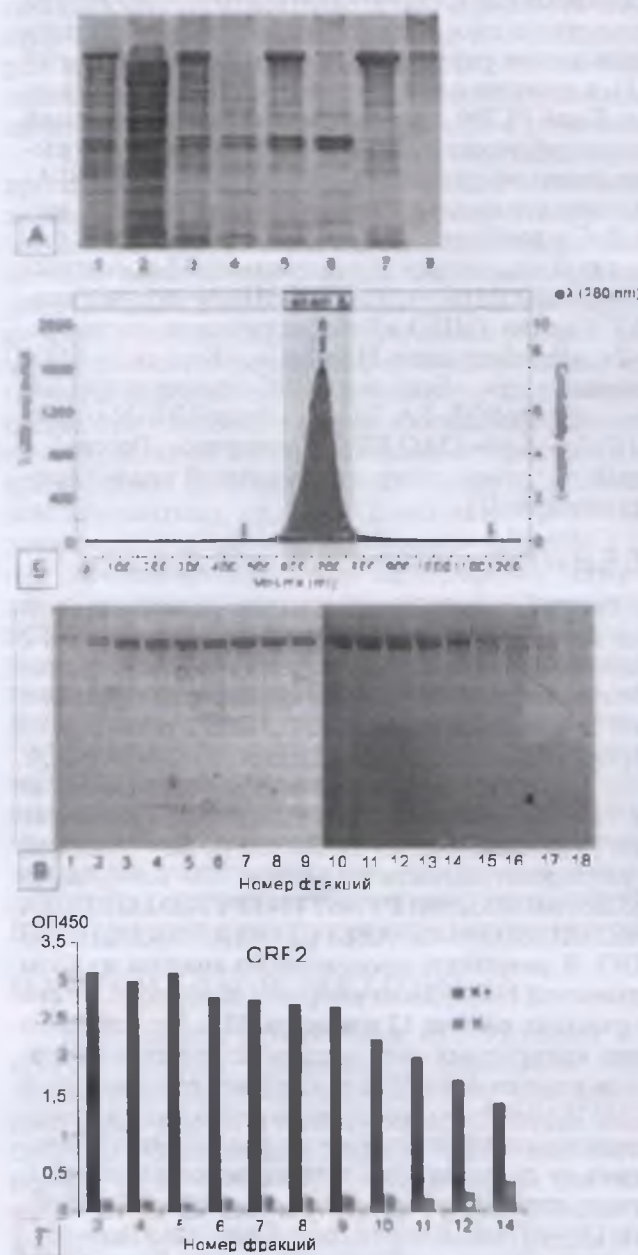
Вестерн-блоттинг и твердофазный непрямой иммуноферментный анализ проводили с помощью ранее описанных методик [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительно проведенный биоинформационный анализ полипептидной последовательности диагностически значимого С-концевого участка белка ORF2 (405–660 а.о.) ВГЕ 3 генотипа показал довольно высокую степень гомологии полипептидных фрагментов разных изолятов вируса. Ранее был клонирован фрагмент генома ВГЕ 3 генотипа, кодирующий N-концевой участок белка ORF2 размером 72 а.о. (MRPRAVLLLFVLLPMLPAPPAGQPSGRRRGRRSGGWGSGFWGNRVNSQPFALPYINPWNPFaanVISQSGA), где в качестве источника вирусоспецифической РНК использовали биоматериал от свиней хозяйств Белгородской обл. [2]. Кроме того, при генотипировании изолятов ВГЕ, выделенных от свиней из Белгородской области, ранее была определена последовательность размером 100 а.о. (Access numbers Genbank MG053288, MG053289, MG053290): PVNSYTNTPYTGA LGLLDFALELEFRNLTPGNTNTRVSRYTSTARHRLRRGADGTAELTTTAATRFMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALTLFNLADTLLGG. В результате проведенного анализа из базы данных нуклеотидных последовательностей NCBI были выбраны наиболее близкие по структуре в приведенных выше участках генома 12 изолятов ВГЕ 3 генотипа, и проведено множественное сравнение кодируемых ими аминокислотных последовательностей белка ORF2. Из них для участка 405–660 а.о. наиболее гомологичной оказалась последовательность HM055578 (Венгрия), которую использовали в качестве консенсуса. Дополнительный сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал высокую степень ее сходства с 102 имеющимися в базах данных белковыми последовательностями: для 7 из них совпадение составило 100 %, для 42 — 99 %, для 36 — 98 %, для 17 — 97 %. В частности, было показано полное совпадение консенсусной последовательности выбранного участка белка ORF2 HM055578 (Венгрия) с последовательностями EU723513.1 (Испания), KJ873911.1 (Германия), KT591532.1 (Франция), FJ653660.1 (Таиланд), LC055973.1 (Япония, Токио), AB850879.1 (Япония).

Для выбранного фрагмента ORF2 была рассчитана соответствующая ему нуклеотидная последовательность, оптимизированная для экспрессии в бактериальной системе *E.coli*. Фрагмент гена *orf2* с дополнительными фланкирующими сайтами рестриктазы BamHI, синтез которого был выполнен компанией «Евроген», вставляли в плазмиду pEL5a по соответствующему сайту рестрикции. После лигирования, трансформации компетентных клеток *E.coli* PLT90, селекции на устойчивость к ампициллину

лину получали отдельные колонии бактерий, из которых выделяли плазмидную ДНК на колонках «Евроген» и проверяли наличие вставки в нужной ориентации с помощью рестрикционного анализа с последующим подтверждающим секвенированием.



Выделение и очистка белка ORF2 BGE 3 генотипа: электрофорез в 10% SDS-полиакриламидном геле по стадиям выделения белка ORF2 из биомассы *E.coli* (1 — биомасса; 2, 4, 6 — супернатанты после последовательных отмывок; 3, 5, 7 — осадки фракции телец включений после последовательных отмывок; 8 — белок ORF2 BGE 1 генотипа [1]) (А); хроматограмма очистки белка ORF2 BGE 3 генотипа методом гель-фильтрации (Б); результаты тестирования фракций белка ORF2 после хроматографической очистки методом электрофореза (В) и методом ИФА (Г), К+ сыворотки крови больных ГЕ, К — сыворотки крови здоровых доноров.

С целью выявления потенциально идентичных линейных эпитопов был проведен анализ гомологий коротких пептидов между белком ORF2 BGE 3 генотипа и белками семейства герпесвирусов человека 1-8 типов. Для этой цели в доступных базах данных полипептидных последовательностей был проведен поиск соответствующих мотивов с их последующим множественным сравнением. Как ранее в случае с белком ORF2 1 генотипа [1], при анализе экспрессируемого фрагмента ORF2 3 генотипа было подтверждено отсутствие заметной гомологии с белками цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейн-Барр (ЭБВ) и других герпесвирусов.

Клоны штаммов-продуцентов рекомбинантного белка ORF2 BGE 3 генотипа, полученные после трансформации компетентных клеток рекомбинантными плазмидами, отбирали, анализируя белковые профили лизатов их культур методами электрофореза и иммуноблоттинга с сыворотками крови больных ГЕ, содержащими специфические IgG. Степень очистки рекомбинантного антигена на отдельных стадиях процесса выделения телец включений из лизата клеток культуры рекомбинантного штамма *E.coli* контролировали с помощью электрофореза в 10% SDS-полиакриламидном геле. Электрофоретический анализ фракций белка после хроматографической очистки подтвердил отделение рекомбинантного полипептида от основной массы примесных белков. Белковые фракции тестировали также методом ИФА в реакциях с пулом образцов сывороток крови, содержащих IgG к BGE, и с пулом отрицательных сывороток (рис.). Фракции, содержащие наибольшее количество целевого белка и

— примесей, а также показавшие наилучшую реактивность в ИФА с положительными сыворотками и минимальные неспецифические взаимодействия — с отрицательными. Объединяли, полученный препарат белка дополнительно исследовали методом электрофореза. Молекулярная масса полученного рекомбинантного белка, определенная по результатам электрофоретического профиля лизатов штамма-реципиента и препаратов выделяемого из них целевого продукта, соответствовала расчетной величине (145 кДа). Продуктивность полученного рекомбинантного белка составила не менее 3 мг рекомбинантного белка на 1 г биомассы. Степень чистоты белка по результатам анализа данных электрофореза с помощью прибора GelDocTM EZImager (BioRad, США) составила 100 %.

Для оценки антигенной специфичности полученного рекомбинантного белка были сформированы контрольные панели образцов сывороток крови, протестированных с помощью коммерческих тест-систем на содержание серологических маркеров и инфицирования вирусами гепатитов А, В, С, Е, ВЭБ, ЦМВ, ВИЧ-1, ВИЧ-2. В качестве антигена сравнения использовали ранее полученный рекомбинантный полипептид ORF2 ВГЕ 1 генотипа [1]. Средние значения оптической плотности (ОП) в исследованных методом ИФА группах образцов при использовании в качестве антигена рекомбинантных белков ORF2 ВГЕ 1 и 3 генотипа представлены в табл.

При взаимодействии с полученным белком ORF2 3 генотипа все 50 образцов (100 %) от больных ГЕ и реконвалесцентов были позитивными с ОП от 0,254 до 1,897 ед. ед. мл. Все образцы, положительно прореагировавшие с рекомбинантным антигеном ORF2 3 генотипа, были выявлены как содержащие специфические IgG в реакциях с ранее полученным рекомбинантным антигеном ORF2 1 генотипа, наблюдаемое при этом несколько сниженное значение ОП. Сред можно объяснить использованием серологического материала из региона с преимущественным распространением вируса 3 генотипа (Республика Беларусь). Результаты тестирования образцов контрольных групп (здоровые доноры, пациенты с вирусными гепатитами А, В и С, ВИЧ-инфицированные лица, больные инфекционным мононуклеозом, цитомегаловирусной инфекцией) показали отсутствие позитивных реакций с полученными рекомбинантными белками, что позволяет сделать заключение о их высокой антигенной специфичности. При использовании в качестве антигена препарата β -галактозидазы, выделенной из биомассы клеток штамма E.coli PLT90, трансформированных плазмидой pEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК, положительных реакций с образцами сывороток опытной и контрольных групп не выявлено.

Сравнительный анализ результатов ИФА, полученных с использованием набора сравнения «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», показал полное совпадение: среди обследованных больных ГЕ и реконвалесцентов не выявлено ложноотрицательных образ-

цов, среди обследованных здоровых доноров и контрольных групп — ложноположительных образцов. Относительно более низкое значение ОП_{сред.} (0,832±0,09) при исследовании положительных проб в референс-наборе можно объяснить отсутствием в составе его антигенной основы белков ВГЕ 3 генотипа [14] и использованием клинических образцов из региона (Республика Беларусь) с преимущественным распространением ВГЕ 3 генотипа.

Сложность выделения протяженных фрагментов геномной РНК из вирусосодержащего клинического материала

Оценка антигенной специфичности рекомбинантных антигенов ORF2 ВГЕ 1 и 3 генотипов методом ИФА

Исследуемая группа	Средняя величина оптической плотности при $\lambda=450$ нм, ОП _{сред.} (M±m)			
	Количество образцов	ORF2 1 генотип	ORF2 3 генотип	Референс-набор ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G* (F151), ОП _{ср.} = 0,195
Больные ГЕ и реконв.	50	1,105±0,113	1,217±0,03	0,832±0,09
Здоровые доноры	75	0,072±0,009	0,028±0,002	0,029±0,005
Больные ГА	20	0,115±0,013	0,074±0,05	0,038±0,006
Больные ГВ	20	0,072±0,009	0,031±0,002	0,027±0,004
Больные ГС	20	0,057±0,008	0,025±0,004	0,031±0,005
ВИЧ-инф.	20	0,069±0,012	0,086±0,004	0,046±0,008
Больные инф. мононук.	20	0,106±0,027	0,048±0,003	0,026±0,01
Больные ЦМВИ	20	0,072±0,009	0,021±0,001	0,034±0,007

объясняет выбор рядом авторов стратегия получения рекомбинантных антигенов с использованием теоретически рассчитанных синтетических аналогов фрагментов вирусного генома, кодирующих иммунодоминантные участки диагностически значимых антигенов ВГЕ [14]. Данный подход был успешно реализован и в нашем исследовании. На основании анализа научной литературы и результатов проведенного биоинформационного исследования была поставлена и решена цель получения рекомбинантного антигена, содержащего фрагмент с 406 по 660 а.о. капсидного белка ORF2 ВГЕ 3 генотипа. Принимая во внимание наличие этапов денатурации в применяемой методике очистки белка из нерастворимых телец включений, можно утверждать, что в его составе присутствуют преимущественно линейные эпитопы. Полученные нами результаты по анализу антигенной реактивности рекомбинантных белков ORF2 ВГЕ 1 и 3 генотипов, а также многолетний успешный опыт применения рекомбинантных антигенов для диагностики ГЕ согласуются с данными исследователей, показавших существенный вклад линейных эпитопов в организацию антигенной структуры капсидного белка ВГЕ. Результаты экспериментов по исследованию взаимодействия рекомбинантных антигенов ВГЕ 1 и 3 генотипов с гомологичными и гетерологичными специфическими антителами показали, что эпитопы С-концевого иммунодоминантного домена отвечают за генотип-специфичную иммунореактивность антигена ORF2 [12]. С другой стороны, в экспериментах по подробному картированию эпитопов в составе С-концевого участка ORF2 показано наличие двух линейных В-клеточных эпитопов в области 411-415 а.о. и 427-430 а.о., общих для штаммов ВГЕ различных генотипов, хозяевами которых являются птицы, свиньи или человек [15]. Полученный в настоящей работе рекомбинантный белок обладает антигенной специфичностью ВГЕ 3 генотипа — источника антропозооноза, что обеспечивает возможность применения не только в медицинской практике, но также в ветеринарии и, с большой вероятностью, для изучения циркуляции вируса среди широкого спектра его природных резервуаров.

В научной литературе имеются сообщения о перекрестной иммунореактивности при выявлении антител к ВГЕ и некоторым герпесвирусам (ВЭБ, ЦМВ), осложняющей интерпретацию результатов серодиагностики ГЕ [8]. Отсутствие гомологий у полученного нами белка и белков герпесвирусов свидетельствует об отсутствии идентичных эпитопов в их составе. Методом ИФА показано отсутствие кросс-реактивности полученного рекомбинантного полипептида с образцами, содержащими серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и возбудителями инфекционной патологии печени другой этиологии.

Для более глубокого изучения антигенных свойств полученного белка планируется проведение исследований на расширенных выборках специфических и контрольных образцов сывороток крови людей и животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.613.21.0057 от 28.07.2016, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61316X0057).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И., Кабаргина В.Ю., Милованова А.В., Воробьев Д.С., Амму Ю.И., Блинов В.М., Нурматов А.З., Нурматов З.Ш., Байызбекова Д.А., Касымов О.Т., Кюрегян К.К., Михайлов М.И., Жаворонок С.В., Зверев В.В. Получение рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита Е первого генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. Журн. микробиол. 2017, 6: 72-80.
2. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Милованова А.В., Амму Ю.И., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Жаворонок С.В., Зверев В.В. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 3 генотипа и оценка его антигенных свойств. Журн. микробиол. 2018, 5: 46-53.
3. Блинов В.М., Гейслер В., Краснов Г.С., Шаргунов А.В., Шурдов М.А., Зверев В.В. Клеточные аналоги вирусных белков. Журн. микробиол. 2014, 2: 101-113.
4. Гловер Д. Новое в клонировании ДНК. Методы. М., 1989.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.

6. Behloul N., Wen J., Dai X. et al. Antigenic composition and immunoreactivity differences between HEV recombinant capsid proteins generated from different genotypes. *Infect. Genet. Evol.* 2015, 34: 211-20.
7. Drobeniuc J., Meng J., Reuter G. et al. Serological assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 51(3): e24-e27.
8. Hyams C., Mabayoje D.A., Copping R. et al. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J. Med. Virol.* 2014, 86(3): 478-483.
9. Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A. et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992, 89(17):8259-8263.
10. Li W., Zhang J., He Z.Q. et al. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid. *J. Biol. Chem.* 2005, 280(5): 3400-3406.
11. Mast E.E., Alter M.J., Holland P.V. et al. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology.* 1998, 27(3): 857-861.
12. Osterman A., Vizoso Pinto M.G., Haase R. et al. Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes. *Virology Journal.* 2012, 9: 28-32.
13. Reza Taherkhani, Manoochehr Makvandi, Fatemeh Farshadpour. Development of enzyme-linked immunosorbent assays using 2 truncated ORF2 proteins for detection of IgG antibodies against Hepatitis E Virus. *Ann. Lab. Med.* 2014, 34(2): 118-126.
14. Ulanova T.I., Obriadina A.P., Talekar G. et al. A new artificial antigen of the hepatitis E virus. *J. Immunoassay Immunochem.* 2009, 30(1): 18-39.
15. Xinjie Wang, Qin Zhao, Lu Dang et al. Characterization of Two Novel Linear B-Cell Epitopes in the Capsid Protein of Avian Hepatitis E Virus (HEV) That Are Common to Avian, Swine, and Human HEVs. *J. Virol.* 2015, 89(10): 5491-501.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

В.Г.Арзуманян, Т.А.Артемяева, А.М.Иксанова

ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И НЕКОТОРЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Оценка активности цельной сыворотки человека и фракции ее антимикробных пептидов против клинически значимых дрожжей и сравнение этих показателей у разных видов млекопитающих. **Материалы и методы.** В исследовании использовали пуловые образцы человеческой, бычьей, кроличьей и мышинной сыворотки; культуры дрожжей *Candida albicans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum*, *Saccharomyces cerevisiae*. Фракции антимикробных (поли)пептидов (АМП-фракции) получали путем фильтрации сывороток через молекулярные фильтры с диаметром пор 100 кДа. Активность сывороток и их АМП-фракций оценивали спектрофотометрическим методом. **Результаты.** Установлено, что активность цельных сывороток млекопитающих варьировала в пределах 73 — 89% независимо от рода дрожжей, тогда как активность АМП-фракций варьировала более значительно. Так, наименьшую чувствительность к АМП-фракциям сывороток проявляли дрожжи *M. furfur* (активность АМП-фракций 0÷13,5%) и *G. candidum* (0÷6,5%), а наибольшую — *R. mucilaginosa* (12,3÷56,4%), *C. albicans* (22,0÷32,9%) и *C. neoformans* (17,1÷29,9%). Активность АМП-фракций человеческой сыворотки значимо не коррелировала ни с одной из таковых у прочих млекопитающих ($r=0,459\pm0,527$). Значимые корреляции имели место между этими показателями для кроличьей и бычьей сывороток ($r = 0,827$), а также для кроличьей и мышинной ($r = 0,753$). **Заключение.** Различия в величинах активности АМП-фракций сывороток в отношении разных родов/видов дрожжей указывают на наличие специфичности, обусловленной различиями в структурной организации цитоплазматической мембраны клеток дрожжей, а также отличиями в составе АМП у разных млекопитающих.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 17—22

Ключевые слова: противогрибковая активность, сыворотка, антимикробные пептиды, дрожжи, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF HUMAN AND SOME MAMMALS SERA

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Estimation of activity of native human serum and its antimicrobial peptides fraction against clinically important yeasts and comparison with the activity of some mammals sera. **Materials and methods.** Pooled samples of human, bovine, rabbit and mouse sera and collection strains of yeasts *Candida albicans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum*, *Saccharomyces cerevisiae* were used in the study. Antimicrobial peptides fractions (AMP) were obtained by filtration through molecular filters with 100 kDa pores. Activity of sera and their AMP-fractions were estimated by spectrophotometric method. **Results.** Activity of native mammal sera varied in diapason 73÷89% independently from yeast genus, although AMP-fractions activity varied more significantly. The minimal sensitivity to AMP-fractions of sera demonstrated *M. furfur* (activity values were equal 0÷13,5%) and *G. candidum* (0÷6,5%), but the maximal — *R. mucilaginosa* (12,3÷56,4%). *C. albicans* (22,0÷32,9%), and *C. neoformans* (17,1÷29,9%). Activity values of AMP-fractions of human serum were correlated meaningfully with no of the values of other mammals (Pirson coefficient $r=0,459\pm0,527$). Considerable correlation of the indexes took place between rabbit and bovine sera ($r=0,827$), as well as between rabbit and mouse sera ($r=0,753$). **Conclusion.** The differences between AMP-fractions activity towards studied yeast genera/species indicate the occurrence of its specificity probably related with structural organization of cytoplasmic membrane of yeast cells as well as with variations in AMP composition in different mammals.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 17–22

Key words: antifungal activity, serum, antimicrobial peptides, yeast, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

ВВЕДЕНИЕ

Противомикробный гуморальный иммунитет сыворотки млекопитающих складывается из белков системы комплемента, иммуноглобулинов и антимикробных пептидов/полипептидов (АМП). Независимо от пути реализации системы комплемента — классического или альтернативного, а также от механизма действия иммуноглобулинов и различных АМП (которых в сыворотке крови свыше 25), происходит, прежде всего, повреждение клеточной мембраны патогенных микроорганизмов или их лизис [15]. На этом свойстве сыворотки основаны все известные на сегодня методы оценки ее микробицидности. Метод определения бактерицидных свойств крови, основанный на классическом способе посевов, входит в «Номенклатуру клинических лабораторных исследований» (п.6.3.2 — общие бактерицидные свойства сыворотки крови, секретов), утвержденную Приказом Министерства здравоохранения РФ № 64 от 21.02.2000 г. Однако в силу трудоемкости и длительности выполнения этот метод не нашел широкого применения в клинической практике. Не менее сложны в выполнении и более современные методы [4, 17]. Недавно нами предложен способ оценки активности фракции антимикробных пептидов эпителиальных секретов, заключающийся в микроскопировании окрашенных суспензий клеток дрожжей *Candida albicans* с целью подсчета процента убитых клеток [2]. Данный метод с некоторыми модификациями можно применить и к сывороткам крови, причем, как к цельным, так и к их низкомолекулярным фракциям (2,8 — 80 кДа), в которые входят АМП, но не иммуноглобулины и белки комплемента. Такая модификация была использована для определения активности АМП-фракций мышинных сывороток [5]. Использование данного способа дает возможность оценить микробицидную активность человеческих сывороток, обусловленную разными их фракциями, и сравнить ее с таковой у других млекопитающих.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Человеческие сыворотки получены из венозной крови 6 здоровых добровольцев женского и мужского пола в возрасте 22 — 24 года. Использована коммерческая бычья сыворотка «Adult bovine serum» (PAA Laboratories GmbH, Австрия), хранившаяся до использования в замороженном виде при -25°C . Пуловую кроличью сы-

воротку получали от 6 здоровых кроликов-самок породы Шиншилла весом 1,5 кг, питомник Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Пуловая мышиная сыворотка получена от 35 беспородных мышей-самок весом 18-20 г из того же питомника. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217—2014).

Использованы штаммы дрожжей *Candida albicans* №927, *Rhodotorula mucilaginosa* №132, *Malassezia furfur* №1451, *Cryptococcus neoformans* №3465, *Geotrichum candidum* №1206, *Trichosporon cutaneum* №18 из коллекции НИИВС им. И.И.Мечникова; *Saccharomyces cerevisiae* Y-375 из ВКМ (Пушино, Россия). Суспензии клеток дрожжей готовили из экспоненциальных культур, выращенных на плотной среде Сабуро (в случае *M. furfur* — на модифицированной среде Диксона) при 25°C из расчета 10^{10} КОЕ/мл.

Для получения АМП-фракций образцы сыворотки фильтровали через молекулярные фильтры «Amicon Ultra-4» (Millipore, Merck) с диаметром пор 100 кДа на центрифуге в течение 45 мин при 7500 об/мин. Определение противогрибковой активности проводили следующим образом: образцы сывороток или их АМП фракций объемом 300 мкл (контрольная пробирка содержала физраствор) соединяли с 50 мкл суспензии дрожжей, пробирки инкубировали 2 часа при 32°C на шейкере, затем смеси центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об/мин, супернатанты удаляли, а к осадкам добавляли по 300 мкл раствора бромкрезолового пурпурного в фосфатном буфере pH 4,6, суспендировали и инкубировали 45 мин при 32°C на шейкере. После этого суспензии вновь центрифугировали и по 50 мкл полученных супернатантов добавляли в заранее подготовленные пробирки, содержащие по 2,5 мл фосфатного буфера pH 4,6. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре при длине волны 440 нм в кюветах 1 см. Противогрибковую активность выражали в процентах и рассчитывали по формуле: $A = (ОП_{\text{контр.}} - ОП_{\text{опыт}}) * 100 / ОП_{\text{контр.}}$, где $ОП_{\text{контр.}}$ — это оптическая плотность смеси из контрольной пробирки; $ОП_{\text{опыт}}$ — это оптическая плотность смеси из пробирки фракции I либо фракции II.

Осадки клеток микроскопировали с помощью микроскопа МБИ-6 («Ломо», СССР) при общем увеличении $\times 1750$. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel. В качестве показателя наличия корреляционных взаимосвязей использовали коэффициент Пирсона (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение величин активности АМП-фракций сыворотки, рассчитанных с использованием метода спектрофотометрии, и величин активности, рассчитанных с помощью микроскопии (т.е. процент убитых клеток), показало наличие корреляции высокой степени ($r=0,836$): соотношение этих показателей составляло в среднем $1,2 \pm 0,1$. То есть, если активность АМП-фракции, полученная методом спектрофотометрии, составляло 30%, то число клеток, убитых при их инкубации с данным образцом сыворотки, равнялось примерно 36%. Необходимо отметить, что расчет активности цельной сыворотки по методу микроскопии невозможен, так как в результате действия этого ликвора клетки дрожжей частично разрушаются с образованием мелких везикул. Тем не менее, в данном случае использование метода спектрофотометрии правомерно, поскольку везикулы также наполняются красителем. Важно отметить, что даже в этом случае остается значительная часть живых клеток. Судя по данным микроскопии можно заключить, что в первую очередь разрушительному воздействию подвергаются именно мертвые клетки.

Результаты оценки противогрибковой активности цельных человеческих, бычьих, кроличьих и мышиных сывороток, а также их АМП-фракций представлены в табл. Видно, что общая противогрибковая активность сывороток млекопитающих примерно одинакова в отношении всех изученных видов дрожжей: она варьирует в пределах 73 — 89%. Исключение составила лишь активность мышиной и бычьей сывороток против *C. neoformans* — 69,4% и 69,2% соответственно.

Противогрибковая активность цельных сывороток и их низкомолекулярных фракций у некоторых млекопитающих

Тип сыворотки	Человеческая сыворотка		Бычья сыворотка		Кроличья сыворотка		Мышиная сыворотка	
	Активность обшая %	^Δ активность АМП фракции %	Активность обшая %	^Δ активность АМП фракции %	Активность обшая %	^Δ активность АМП фракции %	Активность обшая %	^Δ активность АМП фракции %
C.albicans	88,9 ± 1,3	31,3 ± 6,1	83,5 ± 0,2	22,0 ± 3,2	84,7 ± 0,2	32,9 ± 2,0	77,2 ± 0,5	26,2 ± 2,6
R. mucilaginosa	78,1 ± 6,5	12,3 ± 7,2	73,9 ± 0,9	23,4 ± 0,7	75,4 ± 0,3	39,3 ± 1,7	82,5 ± 0,4	56,4 ± 0,8
M. furfur	83,6 ± 0,5	-2,4 ± 1,7	80,9 ± 0,3	9,1 ± 3,2	84,9 ± 0,1	13,5 ± 0,1	84,3 ± 0,3	-4,4 ± 0,6
C. neoformans	79,5 ± 7,8	22,8 ± 10,6	89,8 ± 0,7	29,9 ± 0,5	81,3 ± 0,6	27,6 ± 1,4	69,4 ± 0,6	17,1 ± 1,7
G. candidum	83,8 ± 6,6	5,4 ± 2,6	79,9 ± 0,7	-6,4 ± 2,0	88,4 ± 0,1	6,8 ± 2,6	81,6 ± 0,6	-2,7 ± 3,5
T. cutaneum	77,7 ± 7,7	7,6 ± 7,7	69,2 ± 0,2	-2,8 ± 2,1	73,1 ± 0,3	16,0 ± 1,4	86,3 ± 0,1	15,0 ± 1,8
S. cerevisiae	87,6 ± 1,4	18,6 ± 10,1	83,5 ± 0,1	-5,8 ± 1,8	85,3 ± 0,5	2,9 ± 0,6	89,2 ± 0,3	19,6 ± 1,8

При этом имела место значимая корреляция активности человеческих цельных сывороток разных видов дрожжей с таковой кроличьих ($r=0,724$), но не бычьих ($r=0,401$) и мышинных сывороток ($r=0,207$).

Активность АМП-фракций имела гораздо больший разброс, чем общая активность сывороток. Отрицательные значения в таблице означают, что оптическая плотность опытных растворов была выше контрольной. Это можно объяснить отсутствием противогрибкового действия данной фракции на данный вид дрожжей, в связи с чем, по-видимому, за 2 часа инкубации клетки начинают расти на неактивной фракции, используя ее как субстрат. Таким образом, отрицательные значения можно считать нулевыми в плане их противогрибковой активности. Значения активности АМП-фракций варьировали в диапазоне от 0 до 56,4%. Активность АМП-фракций человеческой сыворотки значимо не коррелировала ни с одной из таковых у прочих млекопитающих ($r=0,459 \div 0,527$). Однако имели место значимые корреляции между этими показателями между кроличьей и бычьей сыворотками ($r=0,827$), а также между кроличьей и мышинной сыворотками ($r=0,753$). При исследовании вклада активности АМП-фракций сывороток разных млекопитающих в общую противогрибковую активность сывороток обращает на себя внимание тот факт, что наименьший вклад соответствует дрожжам *M. furfur* и *G. candidum*, а наибольший — *R. mucilaginosa* и *C. neoformans*.

Человек и животные на протяжении жизни постоянно сталкиваются с различными видами дрожжевых грибов, причем некоторые из них относятся к условно патогенным микроорганизмам. Так, для человека из более чем 200 видов известных дрожжей около 40 считаются условными патогенами, несмотря на то, что эти виды в норме заселяют различные локусы: *Malassezia* spp. — кожу, *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. — кишечник и половые органы, *Geotrichum* spp. и *Saccharomyces* spp. — кишечник [3]. Однако при нарушениях иммунитета, например, при атопическом дерматите, все указанные роды, а также *Trichosporon* spp. и *Cryptococcus* spp. могут являться сильнейшими иммуногенами. Животные также подвержены дрожжевым инфекциям: описаны маститы у коров, связанные с вышеперечисленными родами дрожжей [14], а также криптококковый менингоэнцефалит [9]. Тот факт, что в ответ на взаимодействие с антигенами дрожжей образуются специфические иммуноглобулины (антитела), не вызывает сомнений. Антитела не только помогают распознавать и обезвреживать высокомолекулярные продукты жизнедеятельности дрожжей, но и обладают непосредственной противогрибковой активностью [8]. Поскольку общая микробицидная активность сывороток состоит по большей части из активности комплемента и иммуноглобулинов, то неудивительно, что этот показатель для человеческой сыворотки варьирует примерно в одинаковых пределах в отношении всех изученных видов дрожжей — 77÷89%. Удивительно то, что такие разные млекопитающие, как человек, бык, кролик и мышь, имеют сходные величины этой активности (табл.).

Иная ситуация наблюдается с активностью АМП-фракций: ее величины, конечно, значительно ниже активности цельных сывороток, но варьируют в широком диапазоне, причем у всех представленных видов млекопитающих. На основании по-

лученных данных можно заключить, что имеет место специфичность АМП по отношению к разным видам дрожжей. Это трудно себе представить, поскольку АМП не имеют такой сложной и разветвленной структуры, как иммуноглобулины. Основной мишенью АМП является мембрана микроорганизмов, при атаке которой происходит нарушение целостности мембраны, ведущее к гибели клетки. Несмотря на большое структурное разнообразие, большинство мембраноактивных пептидов образуют амфифильные структуры в присутствии мембраны [6]. Селективное действие АМП обусловлено липидным составом мембран и определяется, в основном, электростатическими взаимодействиями. Так катионные АМП атакуют бактериальные клетки, у которых во внешней мембране содержится большая доля отрицательно заряженных липидов, в отличие от электрически нейтральных мембран клеток эукариот. Кроме того, на антимикробную активность пептидов влияет упаковка и физические свойства липидного бислоя, например, наличие в составе мембраны специфических молекул-мишеней (стеринов, гликофинголипидов) или липидов, влияющих на спонтанную кривизну бислоя, таких как фосфатидилэтаноламин. Кроме того, некоторые пептиды атакуют специфические внутриклеточные мишени [6].

В человеческой сыворотке присутствуют следующие АМП: гепцидин, гистатины, дефензины, кателицидины, дермицидины, аденомедуллин, псориазин, секреторный ингибитор лейкопротеазы, лизоцим, РНКазы, липокалины, азуроцидин, кальпротектин, BPI (бактерицидный белок, повышающий проницаемость мембран — bactericidal permeability-increasing protein) и лактоферрин. Многие из них выполняют несколько функций помимо противомикробной.

Наиболее представленными в человеческой сыворотке в количественном отношении являются лизоцим (2800 ± 800 нг/мл) [7], РНКазы (2200 ± 400 нг/мл) [10] и дермицидины (2100 ± 100 нг/мл) [11]. Их концентрации в данном ликворе вполне соотносятся с их минимальными ингибирующими концентрациями в отношении *C. albicans*, что дает основание считать именно эти АМП отвечающими за противогрибковую активность сыворотки.

Лизоцим при взаимодействии с клетками *C. albicans* оказывает литическое действие на клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану [13]. Человеческие РНКазы легко связываются с мембраной клеток *C. albicans*, что приводит к деполаризации и разрушению мембраны. Помимо дестабилизации мембраны РНКазы атакуют клеточную РНК, что ведет к блокированию механизмов трансляции клеточного белка [12]. Дермицидины, в отличие от большинства АМП, являются отрицательно заряженными молекулами и действуют на клетки по так называемому «звровому» механизму, образуют гексамерные каналы даже при отсутствии липофильных молекул (детергентов или липидов) [16].

Возможно, низкие значения активности АМП-фракции сывороток в отношении клеток *M. furfur* обусловлены именно их необычным строением: помимо обычной клеточной стенки они покрыты липидной «шубкой», которая помогает им выживать в условиях повышенных концентраций солей и липидов на поверхности кожи [1]. АМП человека и мыши, очевидно, не способны преодолеть данный барьер, тогда как АМП быка и кролика все же проявляют некоторую активность против клеток *M. furfur* (табл.). Вероятно, высокая чувствительность клеток *C. albicans*, *R. mucilaginosa* и *C. neoformans* к пептидам АМП-фракции обусловлена строением их мембран и наличием соответствующих клеточных мишеней: скорее всего, какие-то из присутствующих в сыворотке АМП функционируют именно при взаимодействии с клетками этих дрожжей, но не *M. furfur* и *G. candidum*. Тот факт, что клетки наиболее клинически значимых и изученных дрожжей — *C. albicans* и *C. neoformans* — являются высокочувствительными к сывороточным АМП, открывает перспективу создания новых противогрибковых препаратов на основе фракций сывороточных пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

- Арзуманян В.Г. Дрожжи рода *Malassezia*: таксономия, идентификация, значение в экологии и патологии человека. Новое в систематике и номенклатуре грибов (ред. Ю.Т.Дьяков, Ю.В.Сергеев). Москва, Медицина для всех. 2003:458-492.

2. Арзуманян В.Г., Мальбахова Е.Т., Фошина Е.П., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Вартанова Н.О., Шмелева О.А. Патент на изобретение № 2602298 от 21.10.2016 по заявке № 2015113069, приоритет 10.04.2015: Способ определения совокупной активности антимикробных пептидов как маркера состояния местного иммунитета различных эпителиальных тканей. Патентообладатель ФГБНУ НИИВС им. Мечникова.
3. Арзуманян В.Г., Шмелева О.А. Клинически значимые дрожжевые грибы — классификация, антигены и современные методы диагностики. Микология сегодня. Ю.Т.Дьяков, А.Ю.Сергеев (ред.). М.: Национальная академия микологии. 2016, 3:116-139.
4. Поляков Е.Г., Дерябин Д.Г., Грищенко В.А. Патент на изобретение № 2247987 от 10.03.2005, приоритет 22.01.2003. Способ определения бактерицидной активности сыворотки крови. Патентообладатель ООО «Центр научного зондирования» (RU).
5. Arzumanyan V., Shmeleva O., Michailova N. Elevated Activity Levels of Serum Antimicrobial Peptides in Mice as Response to Immunization with Yeast Antigens. Med. Mycol. Open. Access. 2017, 3(1):23.
6. Guimarrès L.L., Marcos S., Toledo M.S. et al. Structural diversity and biological significance of glycosphingolipids in pathogenic and opportunistic fungi Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014, 4:138-146.
7. Johansson B.G., Malmquist J. Quantitative Immunochemical Determination of Lysozyme (Muramidase) in Serum and Urine. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 1971, 27(3):255-261.
8. Kavishwar Amol, Shukla P K. Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of *Candida albicans*. Medical Mycology. 2006, 44(2):159-167.
9. Magalhães G.M., Saut J.P., Beninati T. et al. Cerebral cryptococcomas in a cow. J. Comp. Pathol. 2012, 147(2-3):106-110.
10. Martin L., Koczera P., Simons N. et al. The Human Host Defense Ribonucleases 1, 3 and 7 Are Elevated in Patients with Sepsis after Major Surgery — A Pilot Study. Int. J. Mol. Sci. 2016, 17(3):294-305.
11. Ortega-Martínez I., Gardezabal J., Erramuzpe A. et al. Vitronectin and dermcidin serum levels predict the metastatic progression of AJCC I—II early-stage melanoma. Int. J. Cancer. 2016, 139(7):1598-1607.
12. Salazar V.A., Arranz-Trullen J., Navarro S. et al. Secretory RNase 3 and RNase 7 against *Candida albicans*. Microbiology open. 2016, 5(5):830-845.
13. Sebaa S., Hizette N., Boucherit-Otmani Z. et al. Dose-dependent effect of lysozyme upon *Candida albicans* biofilm. Mol. Med. Rep. 2017, 15(3):1135-1142.
14. Wawron W., Bochniarz M., Piech T. Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 2010, 54:201-204.
15. Zasloff M. Antimicrobial Peptides in Health and Disease. The New England Journal of Medicine. 2002, 347(1):1199-1200.
16. Zeth K., Sancho-Vaello E. The Human Antimicrobial Peptides Dermcidin and LL-37 Show Novel Distinct Pathways in Membrane Interactions. Front. Chem. 2017, 5:86-92.
17. Zimmerman L.B., Worley B.V., Palermo E.F. et al. Absorbance-based assay for membrane disruption by antimicrobial peptides and synthetic copolymers using pyrroloquinoline quinone-loaded liposomes. Anal. Biochem. 2011, 411(2):194-199.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Д.С.Воробьев, И.Б.Семенова, Ю.В.Волох, Э.Е.Романенко, А.П.Батуро, Н.А.Михайлова

СВОЙСТВА НАТИВНЫХ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ АНТИГЕНОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Исследование иммунохимических и иммунобиологических свойств нативных белок-содержащих антигенов пневмококка (БсАП). **Материалы и методы.** Штаммы *S. pneumoniae*, используемые в работе, получены из ЦКП коллекция НИИВС им. И.И. Мечникова. Изучали химический состав, молекулярную массу полученных антигенов в SDS-электрофорезе и титры антител к ним в иммуноферментном анализе (ИФА). Протективную активность БсАП определяли в опытах активной защиты мышей. **Результаты.** Белоксодержащие антигены пневмококка выделяли из *S. pneumoniae* серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F, 23F и 36. По химическому составу препараты содержали от 16 до 35 % белка. В SDS-электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ) установлено, что молекулярная масса БсАП находилась в диапазоне от 14 до 116 кДа. С помощью ИФА показана перекрестная активность нативных антигенов. Практически все препараты реагировали с антимикробной кроличьей сывороткой, полученной к 19F серотипу ($p \leq 0,05$). Сыворотка 14 серотипа была менее активной, с ней взаимодействовали БсАП, полученные из 14 и 19F серотипов ($p \leq 0,05$). В реакции преципитации по Оухтерлони подтверждено, что препараты

серотипов 3, 6B, 14, 19F и 36 реагировали с кроличьей иммунной сывороткой, полученной к серотипу 19F *S. pneumoniae*. В иммуноблоттинге установлено, что БсАП, выделенные из серотипов 3, 6B, 10A, 14, 19F и 36, связывались с моноклональными антителами к пневмококковому белку — пневмолизину. В серии экспериментов *in vivo* показано, что БсАП защищали животных от внутрибрюшинного заражения *S. pneumoniae* в гомологичной и гетерологичной системах ($p \leq 0.05$). **Заключение.** Выявленная иммунохимическая и перекрестная протективная активность БсАП в опытах *in vitro* и *in vivo* позволяет отобрать препараты, полученные из серотипов 6B, 10A, 19F и 36, как наиболее перспективные для дальнейшего изучения внутривидовой протективной активности отдельных нативных белков пневмококка.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 22—28

Ключевые слова: пневмококк, белоксодержащие антигены пневмококка, серотипнезависимая вакцина, иммуногенная активность, перекрестная активность, гомологичная защита, гетерологичная защита

А.С.Семёнов, И.В.Семёнова, Ю.В.Волох, Е.Е.Романенко, А.А.Батуро, Н.А.Михайлова

PROPERTIES OF NATIVE PROTEIN-CONTAINING ANTIGENS OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. The study of immunochemical and immunobiological properties of native protein-containing antigens of pneumococcus. **Materials and methods.** The study was carried out on the strains of the Collective Center «Collection of Mechnikov Res. Inst. for Vaccine and Sera». In the work studied the chemical composition, the molecular weight of the obtained antigens in SDS-electrophoresis and antibody titers in ELISA. Protective activity of protein-containing antigens of pneumococcus was determined in experiments of active protection of mice. **Results.** Protein-containing antigens of pneumococcus were isolated from *S. pneumoniae* serotypes 3, 6B, 10A, 14, 19F, 23F and 36. The chemical composition of the preparations obtained from 16 to 35% protein. In SDS-electrophoresis in polyacrylamide gel it was established that the molecular weight of protein-containing antigens of pneumococcus ranged from 14 to 116 kDa. Using ELISA shows the cross-activity of native antigens. Virtually all drugs reacted with antimicrobial rabbit serum obtained to serotype 19F ($p < 0.05$). Serotype serum 14 was less active and only protein-containing pneumococcal antigens obtained from 14 and 19F serotypes ($p < 0.05$) interacted with it. In the precipitation test according to Ouchterlony it was confirmed that preparations of serotypes 3, 6B, 14, 19F and 36 reacted with rabbit immune serum obtained for *S. pneumoniae* 19F serotype. In immunoblotting it was found that protein-containing antigens of pneumococcus isolated from serotypes 3, 6B, 10A, 14, 19F and 36 were associated with monoclonal antibodies to pneumococcal protein — pneumolysin. **In vivo** experiments it was shown that protein-containing antigens of pneumococcus protected animals from intraperitoneal infection of *S. pneumoniae* in homologous and heterologous systems ($p \leq 0.05$). **Conclusion.** The revealed immunochemical and cross-protective activity of protein-containing antigens of pneumococcus *in vitro* and *in vivo* experiments allows to select drugs derived from serotypes 6B, 10A, 19F and 36, as the most promising for further study of the intraspecific protective activity of individual native proteins of pneumococcus.

Зж. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 22—28

Key words: pneumococcus, protein-containing antigens of pneumococcus, serotype-independent vaccine, immunogenic activity, cross-activity, homologous protection, heterologous protection

ВВЕДЕНИЕ

Проблема инфекций, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, на протяжении нескольких десятилетий остается актуальной для России [1, 2, 5]. Пневмококк способен вызывать тяжелые инвазивные формы заболеваний среди детей и у взрослых людей [15]. Для профилактики пневмококковых инфекций используют зарубежные полисахаридные и конъюгированные вакцины, создающие защиту против ограниченного количества актуальных серотипов *S. pneumoniae* [5, 7]. При смене клинически значимых серотипов возбудителя полисахаридные антигены, входящие в состав пневмококковых вакцин, не позволяют создать защиту от невакцинных штаммов пневмококка [11].

Известно, что белки *S. pneumoniae* наряду с капсулой являются факторами вирулентности микроба и, соответственно, принимают участие в патогенезе инфекции и формировании иммунной защиты [3, 6]. Кроме того, пневмококковые белки обладают высокой гомологией между собой и, соответственно, могут формировать перекрестную внутривидовую защиту [9, 11, 14]. Поэтому перспективным направлением является изучение свойств белков пневмококка с целью выявления наиболее иммуногенных вариантов для создания отечественной серотипнезависимой вакцины.

Вакцины, основанные на конъюгации полисахаридных антигенов и гомологичных белков, предположительно должны создавать более выраженную защиту против *S. pneumoniae* по сравнению с существующими вакцинами.

Целью настоящей работы явилось исследование иммунохимических и иммунобиологических свойств нативных белоксодержащих антигенов пневмококка (БсАП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы штаммы *S. pneumoniae* серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F, 23F и 36, полученные из ЦКП Коллекция ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова.

Опыты проводили на мышах линии Balb/c массой 16-18 г, полученных из питомника НЦ Биомедицинских технологий, филиал «Андреевка».

S. pneumoniae выращивали в сердечно-мозговом бульоне в течение 16-18 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5% содержании углекислого газа. Полученную культуру инактивировали с помощью 0,1 N NaOH, затем ее центрифугировали, отделяли осадок клеток из культуральной жидкости и из надосадочной жидкости выделяли БсАП методом ацетонного осаждения. Полученные препараты лиофилизировали.

Химический анализ БсАП выполняли с помощью традиционных методов. Для определения общего белка в исследуемых препаратах использовали метод [13], углеводы определяли по методу [10], количество нуклеиновых кислот — по методу Спирина. Измерения проводили на спектрофотометре Ultrospec II E, Pharmacia LKB (Швеция). Для характеристики электрофоретической подвижности и определения молекулярной массы БсАП использовали вертикальный SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях [12]. Иммуоблоттинг проводили по общепринятой методике, используя для анализа моноклональные антитела IgG1 к пневмоллизину (100 мкг/мл, Santa Cruz Biotechnology, USA). Специфичность белков оценивали визуально по окрашиванию мембраны.

Иммуоферментный анализ проводили согласно методу [8].

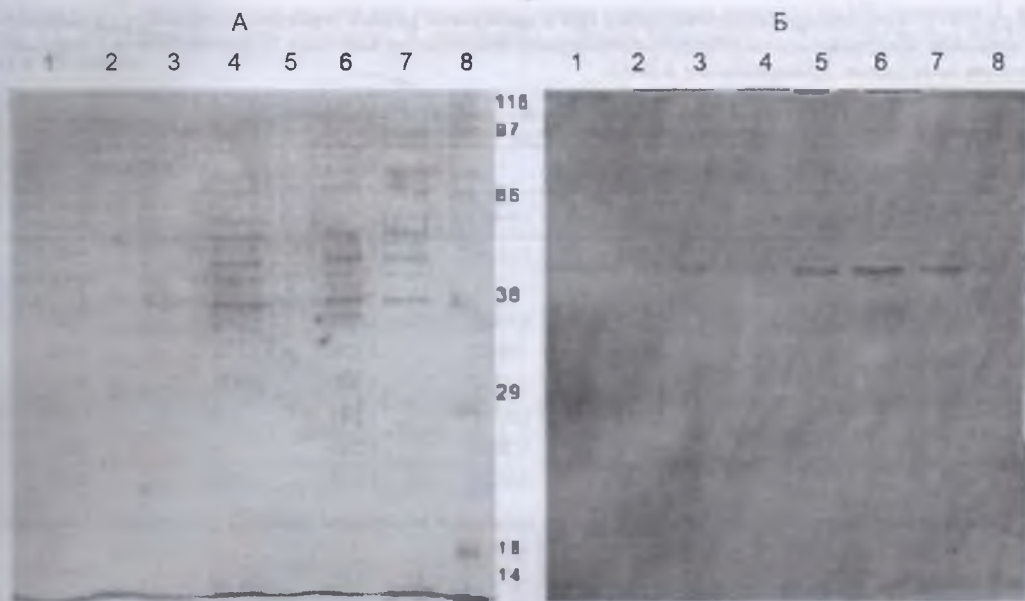
Для иммунизации животных использовали БсАП, которые растворяли в физиологическом растворе без добавления или с добавлением гидроксида алюминия (Sigma, США) из расчета 20 мкг Al(OH)₃ на 1 мкг белка. Сорбцию проводили в течение 12 ч при температуре 4°C. Белоксодержащие антигены пневмококка вводили внутрибрюшинно двукратно с интервалом в 14 дней в дозах 10, 30, 50 и 100 мкг/мышь. Через две недели после повторного введения препарата мышей заражали внутрибрюшинно суточной культурой *S. pneumoniae* в дозе 10⁵ микробных клеток в 0,5 мл физиологического раствора (штамм №3) и в дозе 10⁴ микробных клеток в 0,5 мл физиологического раствора (штамм №1156). В качестве контроля служили неиммунизированные мыши. Наблюдение за животными проводили в течение 10-14 дней.

Статистическая обработка. Результаты оценивали по выживаемости мышей в течение срока наблюдения, рассчитывая достоверность по методу С.А. Гланца [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Белоксодержащие антигены пневмококка получали из *S. pneumoniae* серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F, 23F и 36. По химическому составу препараты содержали от 16 до 35% белка, от 1 до 4% углеводов, от 3 до 6% нуклеиновых кислот.

В SDS-электрофорезе в полиакриламидном геле с использованием белкового красителя Кумасси R-250 выявили в составе полученных препаратов (серотипы 3, 6В, 10А, 14, 19F и 36) белки с молекулярной массой в диапазоне от 14 до 116 кДа (рис. А).



SDS-электрофорез БсАП в 12% ПААГ (А) и нитроцеллюлезная мембрана после иммуноблоттинга БсАП (Б). Концентрация БсАП в каждой дорожке составила 5 мг/мл.

Дорожки: 1 — БсАП 3 №3; 2 — БсАП 3 №1156; 3 — БсАП 6В; 4 — БсАП 10А; 5 — БсАП 14; 6 — БсАП 19F; 7 — БсАП 36; 8 — маркер молекулярной массы.

В иммуноблоттинге определено, что БсАП, выделенные из *S. pneumoniae* серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F и 36, связывались с моноклональными антителами IgG1 к пневмолизину (рис. Б). Это может свидетельствовать о перекрестной активности пневмолизина, содержащегося в препаратах, полученных из разных серотипов пневмококка.

В реакции преципитации по Оухтерлони БсАП серотипов 3, 6В, 14, 19F и 36 в концентрации 1 мг/мл реагировали с кроличьей иммунной сывороткой, полученной к серотипу 19F *S. pneumoniae*, что свидетельствовало о наличии перекрестно-реагирующих антигенов в изучаемых препаратах.

С помощью ИФА подтверждена перекрестная антигенная активность БсАП. Практически все препараты выявляли антитела в антимикробной кроличьей сыворотке, полученной к 19F серотипу (табл. 1). Отмечено повышение титров антител в 4 раза к БсАП 10А серотипа, в 16 раз к БсАП серотипов 3 (штамм №3), 6В и 36, в 32 раза к БсАП серотипов 14, 19F и 23F ($p < 0,05$). Исключение составил препарат, выделенный из серотипа 3 (штамм №1156), который выявлял высокий титр антител в контроле. Антимикробная кроличья сыворотка, полученная к 14 серотипу, оказалась менее активной, в ней определяли повышение титра антител в 32 раза в гомологичной системе и повышение титра антител в 4 раза к БсАП 19F ($p < 0,05$).

При взаимодействии с моноклональными антителами к пневмолизину БсАП, выделенных из серотипов 19F и 36, наблюдалось повышение титров антител в 4 и 8 раз (табл. 1), соответственно, что свидетельствовало о наличии этого белка в БсАП серотипов 19F и 36.

Белоксодержащие антигены пневмококка, полученные из серотипа 3, после двукратной иммунизации мышей с интервалом 14 дней защищали животных от заражения 8 LD₅₀ *S. pneumoniae* серотипа 3 №3 в дозах от 10 до 100 мкг/мышь. Защита составила 80-90 %, а при использовании сорбированного варианта — 100 % выживших ($p < 0,05$) при 90% гибели мышей в контроле. При большей заражающей дозе (25 LD₅₀ *S. pneumoniae*) выявлена значимость добавления гидроксида алюминия.

Таблица 1. Титр перекрестнореагирующих IgG к препаратам разных серотипов в сыворотках кроликов, иммунизированных инактивированными микробными клетками *S. pneumoniae* с конъюгированными антителами к пневмолизину в ИФА

Белоксодержащие антигены пневмококка разных серотипов, сорбированные на твердой фазе	Титр IgG в сыворотках кроликов, иммунизированных инактивирован- ными микробными клетками <i>S. pneumoniae</i> серотипов				Титр IgG в сыворотках кроликов, иммунизированных инактивирован- ными микробными клетками <i>S. pneumoniae</i> серотипов	
	14		19F		3 №3	
	Опыт	Контроль (интактные)	Опыт	Контроль (интактные)	Опыт	Контроль (ин- тактные)
3 №3	1:280	1:140	1:1920*	1:120	1:160	1:80
3 №1156	1:140	1:560	1:960	1:960	1:160	1:80
6B	1:140	1:140	1:1920*	1:120	1:160	1:80
10A	1:140	1:140	1:960*	1:120	1:160	1:80
14	1:4480*	1:140	1:3840*	1:120	Н.о.	Н.о.
19F	1:1120*	1:280	1:3840*	1:240	1:640*	1:160
23F	1:280	1:140	1:3840*	1:240	Н.о.	Н.о.
36	1:280	1:140	1:1920*	1:120	1:640*	1:80

Примечание. * Достоверность разницы между опытом и контролем ($p \leq 0,05$), увеличение титра антител в 4 и более раз, ** Н.о. — не определяли.

При иммунизации мышей БсАП в дозах 10 и 50 мкг/мышь защита составила 50% животных. Однако при использовании гидроксида алюминия все испытанные дозы создавали защиту на уровне 80-90% ($p \leq 0,05$). Контроль гидроксида алюминия показал, что он не защищал мышей от заражения *S. pneumoniae*.

На следующем этапе изучена протективная активность препаратов БсАП в гомологичной и гетерологичной системах. Мышей иммунизировали двукратно антигенами, полученными из *S. pneumoniae* серотипов 3 №3, 14 и 19F в дозе 30 мкг/мышь с добавлением гидроксида алюминия (табл. 2, опыт I). Полученные результаты свидетельствовали, что все препараты защищали мышей от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 штамм №3 на 3 день после заражения, когда отмечалась 100% гибель животных в контроле. Подтвердилась высокая протективная активность БсАП серотипа 3 при заражении гомологичным серотипом. Среди БсАП других серотипов более активным оказался препарат серотипа 19F (80% выживших мышей), препарат из серотипа 14 защищал 60 % мышей. При наблюдении в течение 10 дней было выявлено, что гомологичный БсАП серотипа 3 защищал 100% мышей, гетерологичный БсАП, выделенный из серотипа 19F, защищал 70% животных ($p \leq 0,05$), животные, иммунизированные препаратом из серотипа 14, к этому сроку погибли.

При увеличении дозы до 50 мкг/мышь в эксперименте выявлена перекрестная протективная активность препаратов БсАП, полученных из серотипов 6B, 10A, 14, 19F и 23F от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 №1156 (табл. 2, опыт II). Подтверждено, что гомологичный БсАП защищал 100% мышей при 90% гибели в контроле. Протективный эффект гетерологичных БсАП различался: препарат из серотипа 6B защищал 100% мышей, из серотипа 19F — 90%, а из серотипов 10A, 14 и 23F — 80% животных соответственно ($p \leq 0,05$). Смесь БсАП из серотипов 6B, 10A, 14, 19F и 23F в суммарной дозе 50 мкг также защищала 80% мышей ($p \leq 0,05$).

Аналогичные данные получены при увеличении иммунизирующей дозы до 100 мкг/мышь (табл. 2, опыт III). Повторно изучена перекрестная протективная активность препаратов БсАП, выделенных из серотипов 6B, 10A, 14, 19F, 23F и смеси от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 №1156. Белоксодержащие антигены пневмококка, выделенные из серотипа 3, защищали 90% мышей ($p \leq 0,05$), как и гетерологичные БсАП из серотипов 6B и 36 ($p \leq 0,05$). В группе животных, получавших препараты из серотипов 10A, 14, 19F и 23F, наблюдалась выживаемость от 60 до 70%. Однако статистически значимой разницы между опытом и контролем в этих группах не выявлено. В контроле выжило 30 % мышей.

В предварительных опытах по изучению активной защиты мышей выявлена протективная активность БсАП в гомологичной системе. В качестве модельного

Таблица 2. Выживаемость мышей при внутрибрюшинном двукратном введении БсАП серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F, 23F и 36 против заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 штам №3** (I опыт) и штам №1156** (II и III опыты)

№№ опытов	Название препарата для иммунизации	Выживаемость на 3 сутки***	Критерий значимости, Z
I	БсАП т.3 №3	10/10	4,12****
	БсАП т.14	6/10	2,69****
	БсАП т.19F	8/10	3,38****
	Контроль	0/10	—
Выживаемость на 10 сутки***			
II	БсАП т.3 №1156	10/10	3,83****
	БсАП т.6В	10/10	3,83****
	БсАП т.10А	8/10	2,94****
	БсАП т.14	8/10	3,2****
	БсАП т.19F	9/10	3,57****
	БсАП т.23F	8/10	3,12****
	БсАП т.6В + т.10А + т.14 + т.19F + т.23F	8/10	3,12****
	Контроль	1/10	—
	БсАП т.3 №3	9/10	2,52****
	БсАП т.3 №1156	9/10	2,52****
III	БсАП т.6В	9/10	2,52****
	БсАП т.10А	6/10	1,39
	БсАП т.14 (5 сер.)	7/10	1,76
	БсАП т.19F	7/10	1,69
	БсАП т.23F	7/10	1,87
	БсАП т.36	9/10	2,52****
	Контроль	3/10	—

Примечание. * Заражение через 2 недели после двукратного введения БсАП серотипов 3 (штаммы №3 и №1156), 6В, 10А, 14, 19F, 23F и 36; ** для опыта I заражающая доза составила 19,95 LD₅₀, для опыта II — 2,0 LD₅₀, для опыта III — 1,6 LD₅₀; *** в числителе число выживших мышей на 10 день, в знаменателе — число зараженных животных; **** достоверность разницы между опытом и контролем ($p < 0,05$) при $Z \geq 1,96$ при сравнении кривых выживаемости по С.А. Гланцу. Доза препарата (мкг/мышь): I — 30, II — 50, III — 100.

штамма *S. pneumoniae* использовали штамм серотипа 3 №3, из которого выделяли БсАП и против которого проверяли способность препарата создавать защиту. Установлено, что препарат в иммунизирующих дозах 10, 50 и 100 мкг/мышь при различных заражающих дозах защищал животных от развития пневмококковой инфекции.

В серии экспериментов на животных получены результаты, подтверждающие гетерологичную защиту. Белоксодержащий антиген пневмококка, полученный из серотипа 19F, защищал 70% мышей при заражении *S. pneumoniae* серотипа 3 штам №3, в то время как БсАП, выделенный из серотипа 14, в этом же опыте не защищал животных. Препараты БсАП, полученные из серотипов 6В, 10А, 14, 19F, 23F, защищали мышей от заражения гетерологичным штаммом №1156 *S. pneumoniae* серотипа 3. Защита составила 80-100%. Препараты, полученные из серотипов 6В и 36, защищали 90% животных при заражении *S. pneumoniae* серотипа 3 штам №1156, а БсАП, выделенные из серотипов 14 и 19F, обеспечивали выживаемость 70% мышей, что оказалось статистически не достоверным, поскольку в контроле выжило 30% животных. Очевидно, разница в результатах зависела от иммунизирующих и заражающих доз. Сорбция БсАП на гидроксиде алюминия усиливала протективную активность в опытах по изучению гомологичной и гетерологичной защиты.

Эксперименты по определению перекрестной иммуногенной активности БсАП в реакции Оухтерлони и ИФА показали, что большинство препаратов (за исключе-

нием БсАП серотипа 10А в реакции преципитации) реагировали с антимикробной кроличьей сывороткой, полученной к 19F серотипу *S. pneumoniae*. В ИФА с кроличьей сывороткой, полученной к 14 серотипу *S. pneumoniae*, взаимодействовали только БсАП 14 и 19F серотипов. В целом, можно сказать, что полученные данные опытов *in vitro* подтверждаются результатами опытов *in vivo*.

Таким образом, БсАП, выделенные из *S. pneumoniae* серотипов 6В, 10А, 19F и 36, можно рассматривать как наиболее перспективные для дальнейшего изучения протективной активности отдельных нативных белков, входящих в их состав.

В мировой литературе описаны исследования по разработке экспериментальных вакцин на основе рекомбинантных белков пневмококка [11], в частности, пневмококкового поверхностного белка А (PspA); пневмолизина (Ply); пневмококкового поверхностного антигена А (PsaA) и других. Поэтому представляет, несомненно, интерес факт обнаружения пневмолизина с помощью моноклональных антител в большинстве выделенных БсАП. Учитывая трудоемкость выделения очищенных нативных белков *S. pneumoniae*, в дальнейшем планируются работы по получению ключевых рекомбинантных белков для создания отечественной серотипнезависимой пневмококковой вакцины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белошицкий Г.В., Королева И.С. Серотиповая характеристика штаммов *S. pneumoniae* в Москве. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 1 (74): 90-97.
2. Вишнякова Л.А., Резцова Ю.В., Сологуб Т.С. и др. Этиология острой пневмонии на фоне гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций. Журн. микробиол. 1986, 8: 5-10.
3. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Курбатова Е.А. Белки *Streptococcus pneumoniae*: перспективы создания вакцины против пневмококковой инфекции. Журн. микробиол. 2010, 6: 98-104.
4. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика. М., Практика 1999.
5. Костинов М.П., Андреева Н.П., Петрова Т.И. Клиническая и эпидемиологическая эффективность вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у детей. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013, 3: 45-52.
6. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Факторы патогенности пневмококка и их протективные свойства. Журн. микробиол. 2014, 3: 67-77.
7. Харит С.М. Пневмококковые вакцины. Вакцины и вакцинация. Под ред. В.В. Зверева, Б.Ф. Семенова, Р.М. Хаитова. М., ГЭОТАР-Медиа, 2011.
8. Ястребова Н.Е., Ванеева Н.П., Демин А.А. и др. Иммуноферментный анализ антител к нативной и денатурированной ДНК. Иммунология. 1987, 5: 73-75.
9. Chen A., Mann B., Gao G. et al. Multivalent pneumococcal protein vaccines comprising pneumolysinoid with epitopes/fragments of CbpA and/or PspA elicit strong and broad protection. Clin. Vaccine Immunol. 2015, 22 (10): 1079-89.
10. Dubois K., Gillers K., Hamilton J. et al. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956, 28 (3): 350-356.
11. Feldman C., Anderson R. Review: Current and new generation pneumococcal vaccines. J. Infect. 2014, 69 (4): 309-325.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. 1970, 227: 680-685.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193: 265-275.
14. Tarahomjoo S. Recent approaches in vaccine development against *Streptococcus pneumoniae*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2014, 24 (4): 215-27.
15. Weiser J.N., Ferreira D.M., Paton J.C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. Nat. Rev. Microbiol. 2018, 16 (6): 355-367.

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ АНТИГЕНОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Сравнительный анализ иммунобиологических свойств поверхностных антигенов клеточной стенки и внеклеточных белоксодержащих антигенов *Staphylococcus aureus*. **Материалы и методы.** Препараты: поверхностные антигены клеточной стенки (пептидогликан, тейхоевые кислоты, белковые антигены) штаммов *S. aureus*, входящие в стафилококковую вакцину «Стафиловак» (СВ) и внеклеточные белоксодержащие антигены *S. aureus* (ЭБСП). Показатели врожденного иммунитета оценивали по влиянию препаратов на иммунофенотип мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) селезенки мышей, экспрессию Toll-подобных рецепторов (с помощью проточной цитометрии), фагоцитарную активность макрофагов перитонеального экссудата мышей при введении СВ и ЭБСП; протективную активность препаратов изучали в экспериментах активной защиты мышей линии BALB/c. **Результаты.** Для выделения ЭБСП использовали вирулентный штамм *S. aureus* №6, а для получения поверхностных антигенов клеточной стенки отобрано 4 штамма, из которых наиболее иммуногенным и являлся слабовирулентный штамм *S. aureus* №1991. Оба препарата увеличивали количество TLR2 и МНС II экспрессирующих клеток; введение СВ вызывало нарастание численности клеток с маркером CD25, отражающим раннюю активацию иммунокомпетентных клеток, а иммунизация ЭБСП приводила к более кратковременной экспрессии этого маркера. С другой стороны, повышенное количество CD19 позитивных клеток выявлялось более длительно при иммунизации ЭБСП. Установлена наиболее продолжительная активация фагоцитоза под действием СВ. Отмечена высокая протективная активность обоих типов изучаемых препаратов. **Заключение.** Антигены клеточной стенки и внеклеточные экспериментальные белоксодержащие препараты сопоставимы по иммунобиологическим свойствам, однако поверхностные антигены в большей степени активируют врожденный иммунитет, а внеклеточные — адаптивный иммунитет.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 29—36

Ключевые слова: стафилококковая вакцина, «Стафиловак», внеклеточные экспериментальные белоксодержащие препараты — ЭБСП, эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета

I.M.Gruber, N.B.Egorova, E.A.Astashkina, N.K.Akhmatova, E.A. Kurbatova, L.S.Cherkasova,
O.M.Kukina

IMMUNOGENIC PROPERTIES OF CELLULAR AND EXTRACELLULAR PROTEIN-CONTAINING ANTIGENS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Mechnikov Reseach Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Comparative study of immunobiological properties of cell wall surface antigens and extracellular protein-containing antigens of *Staphylococcus aureus*. **Materials and methods.** Preparations: surface antigens of the cell wall (peptidoglycan, teichoic acids, protein antigens) of the strains of *S. aureus* containing in the staphylococcal vaccine «Staphylovac» (SV) and extracellular protein-containing antigens of *S. aureus* (EPCA). The parameters of innate immunity were evaluated by the effect of preparations on the immunophenotype of mononuclear leukocytes (ML) of the spleen of mice, expression of Toll-like receptors (using flow cytometry), phagocytic activity of macrophages of peritoneal exudate of mice after the introduction of SV and EPCA; the protective activity of preparations was studied in experiments of active protection of BALB/c mice. **Results.** To isolate EPCA, we used the virulent strain of *S. aureus* №6, and for obtaining surface antigens of the cell wall, 4 strains were selected, the most immunogenic of which was the low virulent strain of *S. aureus* №1991. Both preparations increased the number of TLR2 and MHC II expressing cells; CV administration caused an increase in the number of cells with CD25 marker, reflecting the early activation of immunocompetent cells, and EPCA immunization — led to a shorter expression of this marker. On the other hand, an increased number of CD19 positive cells were detected for a longer period of time during EPCA immunization. The longest activation of phagocytosis under the action of SV was established. High protective activity of both types of the studied preparations was noted. **Conclusion.** The antigens of the cell wall and extracellular pro-

tein-containing experimental drugs possessed comparable immunological properties, however, the surface antigens to a greater extent activate innate immunity, and extracellular — adaptive immunity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 29—36

Key words: staphylococcal vaccine, «Staphylovac», extracellular experimental protein containing preparations — E BSP, effectors of innate and adaptive immunity

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания, вызываемые *Staphylococcus aureus*, в настоящее время являются одной из важнейших проблем здравоохранения всего мира; они разнообразны по формам и включают поражения кожи и мягких тканей, инвазивные инфекции. *S. aureus* — оппортунистический бактериальный патоген, часто являющийся причиной инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) и внебольничных инфекций (ВИ), включающих бактериемию, эндокардит, остеомиелит, септический артрит и пневмонию. Повсеместное увеличение распространения заболеваний стафилококковой этиологии в последние годы [4] сопровождается увеличением резистентности возбудителей к антибиотикам. Кроме того, многие антибиотики, обладая иммуносупрессивными свойствами, снижают защитные силы организма. Трудность терапии определяют необходимость профилактики и комплексного лечения стафилококковой инфекции, включающего использование антибактериальных и иммунобиологических препаратов, активирующих иммунную систему [9]. Разработка стафилококковых вакцин велась по нескольким направлениям: наиболее подробно изучали вакцины, приготовленные из микробных клеток; в течение длительного времени использовали анатоксины. При клинических исследованиях эффективность большинства разрабатываемых в последние годы препаратов не была подтверждена, поэтому в настоящее время отсутствуют коммерческие противостафилококковые иммунопрепараты с эффективностью, подтвержденной клиническими испытаниями [13].

В НИИВС им. И.И. Мечникова коллективом авторов под руководством Н.Б. Егоровой разработана стафилококковая вакцина «Стафиловак» на основе комплекса поверхностных антигенов клеточной стенки (пептидогликан, тейхоевые кислоты, белковые антигены клеточной стенки) из иммуногенных штаммов *S. aureus*, обладающих внутривидовой перекрестной протективной активностью. В клинических исследованиях при включении в комплексную терапию хронических стафилококковых инфекций она оказывала длительный терапевтический эффект [5]. В настоящее время в вакцине расширен штаммовый состав, разработана промышленная технология получения препарата и завершены доклинические исследования.

В последние годы при разработке противостафилококковых вакцин внимание исследователей привлекает другое направление, связанное с использованием конструкций, в которых участвуют экзопротеины — поверхностные и/или непосредственно секретируемые в питательную среду факторы вирулентности [10, 13, 14]. Число этих факторов более 30 и по механизму действия они группируются как поверхностные белки, ответственные за адгезию и колонизацию тканей хозяина и за распространение в тканях, подавляющие фагоцитоз и поддерживающие жизнеспособность фагоцитов, способствующие уходу от иммунного ответа хозяина и модулирующие иммунный ответ, а также детерминанты присущей и приобретенной резистентности к антибиотикам.

Исследования, проводимые в настоящее время, касаются, в основном, создания и испытания 2 типов вакцин: предупреждающих колонизацию и индуцирующих адаптивный иммунный ответ [11]. В последние годы до I фазы клинических испытаний успешно дошли 3 вакцины — «Стафиловак» (на основе комплекса поверхностных антигенов клеточной стенки), PentaStaph (на основе капсульных полисахаридов (КП) 5 и 8 типов, нетоксичной формы альфа-токсина, лейкоцидина Пантона-Валентайна — PVL и тейхоевых кислот) и NDV-3 (содержащая хлопьеобразующий фактор адгезии — ClfA), у которой завершена I фаза клинических исследований [3, 13]. К 2016 г. на I фазе клинических испытаний находились 2 токсинные вакцины —

мультивалентная и рекомбинантная детоксицированная SEB вакцина; II фазу клинических испытаний проходят 2 вакцины: четырехкомпонентная вакцина (GSK, Бельгия), содержащая КП5 и КП8, конъюгированные со столбнячным токсиндом, мутантные формы α -токсина и ClfA, и комплексная вакцина SA4Ag (Pfizer, США) на основе ClfA, металл-связывающего компонента MntC, КП 5 и 8, представляющая (на данный момент) наиболее перспективной [12].

В НИИВС им. И.И. Мечникова исследования проводятся в двух направлениях: как отмечено выше, они касаются поверхностных антигенов клеточной стенки, входящих в «Стафилобак», и внеклеточных белоксодержащих антигенов *S. aureus*.

Цель исследования: сравнительный анализ иммунобиологических свойств поверхностных антигенов клеточной стенки и внеклеточных белоксодержащих антигенов *S. aureus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено изучение двух типов препаратов: стафилококковой вакцины «Стафилобак», содержащей в своем составе поверхностные антигены клеточной стенки (пептидогликан, тейхоевые кислоты, белковые антигены) 4 штаммов *Staphylococcus aureus* №№5,9,1986,1991, полученных с использованием шадящих методов выделения, позволяющих сохранить их структуру и, соответственно, активность; внеклеточных белоксодержащих антигенов *S. aureus* (экспериментальных белоксодержащих препаратов — ЭБСП), выделенных методом ионно-обменной хроматографии из фильтрата культуральной жидкости, полученной после динамического периодического культивирования *S. aureus* №6 в полусинтетической среде до конца фазы экспоненциального роста [1].

Показатели врожденного и адаптивного иммунитета оценивали по влиянию препаратов на иммунофенотип мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) селезенки мышей и экспрессию Toll-подобных рецепторов методом проточной цитометрии на приборе Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, США) с применением моноклональных антител (МКА) (eBiosciences, США), меченных флуорохромом, к определяемому маркеру. Мышей линии BALB/c иммунизировали внутрибрюшинно трехкратно 200 мкг СВ или двукратно 1,2 мкг ЭБСП. Учет результатов проводили через 7 суток после иммунизаций.

Фагоцитарную активность макрофагов перитонеального экссудата мышей (СВА, 10-12 мг) изучали через 1 и 7 суток после внутрибрюшинного введения СВ и ЭБСП. Фагоцитарную активность клеток оценивали по поглотительной способности *S. aureus* 1991 в мазках, сделанных после 30- и 60-минутной инкубации при расчете показателей: фагоцитарного индекса (ФИ) — процента клеток, вступивших в фагоцитоз, фагоцитарного числа (ФЧ) — среднего числа бактерий, находящихся внутриклеточно (частное от деления общего числа поглощенных бактерий на число клеток, вступивших в фагоцитоз) и индекса бактерицидности фагоцитов (ИБФ) — отношения числа убитых внутри фагоцитов микробов к общему числу поглощенных фагоцитами микробов в %.

Протективную активность препаратов изучали в экспериментах активной защиты мышей линии BALB/c (самцов) массой 12-14 г при разных способах иммунизации и заражения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в процессе разработки стафилококковой вакцины при исследовании штаммов-продуцентов протективных антигенов была изучена биологическая активность 16 свежевыделенных, музейных и производственных штаммов *S. aureus* [7]. При этом была установлена их вариабельность и отсутствие корреляции между иммуногенностью штаммов и их вирулентностью и сенсибилизирующими свойствами. Наиболее иммуногенным при выделении поверхностных антигенов клеточной стенки оказался менее вирулентный шт. №1991 (табл. 1). Была выявлена его способность стимулировать систему врожденного иммунитета, т.к. уже через сутки после однократной имму-

Таблица 1. Характеристика иммуногенной активности штаммов *S. aureus*, используемых при разработке протективных стафилококковых препаратов на основе антигенов клеточной стенки (СВ) и экспериментальных внеклеточных белоксодержащих антигенов (ЭБСП)

Иммунизирующий препарат из штаммов <i>S. aureus</i>			Заражающий шт., №	Протективная активность	
Препарат	№ штамма	Вирулентность $LD_{50} \times 10^9$ м.к.		Число выживших мышей/всего заражено	% выживших мышей
Поверхностные ан- тигены клеточной стенки	6	0,1	6	1/24	4
	1986	0,18	1986	18/45	40
	1991	1,0	6	13/20	65
	1991	1,0	1986	23/45	51
	Смесь шт. 5,9,1986,1991	-	1986	22/45	48,9
	Контроль	-	6	0/25	0
Внеклеточные белок- содержащие антигены		-	1986	2/25	8
	1991	>1,0	1986	5/10	50
			6	1/10	10
	6	0,18	1986	7/10	70
			6	8/10	80
	Контроль	-	1986	0/10	0
		-	6	0/10	0

Примечание: Контроль — интактным мышам вводили 0,9% раствор натрия хлорида.

низации выживало более 50% мышей, зараженных вирулентными штаммами №№ 6 и 1986. А препарат из клеточных стенок, полученный из наиболее вирулентного шт. №6, практически не обладал протективной активностью и перекрестной протективной активностью к различным условно патогенным микроорганизмам [8]. Использование щадящего метода выделения поверхностных антигенов клеточной стенки (инактивация диметилкетонем, водная экстракция) обеспечило сохранение иммуногенности [6]. Полученный препарат стафилококковой вакцины (СВ) обладал протективной активностью при невысоких показателях токсичности и сенсibiliзирующих свойств. Разработанная в НИИВС им. И.И. Мечникова сухая стафилококковая бесклеточная вакцина [6], приготовленная из комплекса поверхностных антигенов клеточной стенки (пептидогликан, тейхоевые кислоты, белковые антигены клеточной стенки) 4 штаммов *S. aureus* №№5,9,1986,1991, была разрешена к применению в медицинской практике еще в 1996 г. (Приказ МЗ РФ 3144/53 от 10.04.1996), однако ее производственный выпуск не был налажен. Вместе с тем, клинические исследования, проведенные на разных базах, показали, что включение данной вакцины в комплексную терапию хронических стафилококковых инфекций оказывает длительный терапевтический эффект: она снижала тяжесть обострений, удлиняла период ремиссии, сокращала потребность антибиотикотерапии, способствовала индукции интерферона и антител [5]. Предложенная вакцина в настоящее время усовершенствована: разработана промышленная технология получения препарата, включающая осуществление реакторного культивирования продуцентов в полусинтетической питательной среде, изменение фазы роста микроба и методов выделения антигенных препаратов, что потребовало изучения ее иммунобиологических свойств. В доклинических исследованиях серий вакцины было установлено, что препарат обладает антигенными и протективными свойствами, не токсичен, не обладает алергизирующим действием, тератогенностью и мутагенностью, не пирогенен, не иммунотоксичен *in vitro* и *in vivo*.

При определении штамма *S. aureus* — продуцента внеклеточных белоксодержащих антигенов из охарактеризованных имеющихся в коллекции лаборатории, была изучена протективная активность антигенов из двух штаммов, «оппозитных» по вирулентности при внутрибрюшинном заражении: слабовирулентного вакцинного штамма №1991 ($LD_{50} = (0,5-2,0) \times 10^9$ м.к.); высоковирулентного штамма №6 ($LD_{50} = (0,04-1,9) \times 10^8$ м.к.).

Полученные в этих опытах результаты оценки протективной активности стафилококковой вакцины и внеклеточных экспериментальных белоксодержащих препаратов, приготовленных из высоко- и слабовирулентных штаммов, представлены в табл. 1. Установлено, что препарат поверхностных антигенов клеточной стенки из наиболее вирулентного штамма №6 оказался практически неэффективным. В то же время, при двукратной иммунизации мышей внеклеточными белоксодержащими антигенами в дозе 1,0 мкг белка, полученными по разработанной технологии [2], из иммуногенного слабо вирулентного шт. №1991 и вирулентного шт. №6, отмечена большая выживаемость мышей, иммунизированных препаратом из вирулентного шт. №6, при заражении 2,2 LD₅₀ штаммов №№1986 и 6 (что составило, соответственно, 2,5x10⁹ и 0,4x10⁹ м.к.). Эти результаты явились предпосылкой для последующего использования штамма *S. aureus* №6 при получении ЭБСП.

Внеклеточные ЭБСП выделяли из фильтрата культуральной жидкости, полученной после динамического периодического культивирования *S. aureus* №6 в полусинтетической среде до конца фазы экспоненциального роста [1]. Наиболее очищенная фракция, при изучении электрофоретической подвижности которой показано присутствие одной полосы в области 90-100 кДа, четырех отдельных полос в области 31-60 кДа и одной четкой полосы в области 24 кДа, содержит 31,2±18,1 мкг/мл белка, 9,5±3,1 мкг/мл углеводов и 7,0±2,5 мкг/мл нуклеиновых кислот. В этой фракции установлено присутствие факторов патогенности: хлопьеобразующие факторы А и В, препятствующие эффективному фагоцитозу, и стрессовый белок супероксиддисмутаза, защищающая бактерию от окислительного стресса.

Сравнительные данные анализа действия «Стафиловак» и внеклеточных белоксодержащих антигенов при иммунизации мышей линии BALB/c на показатели врожденного и адаптивного иммунитета приведены в табл. 2. Установлено, что СВ после одно- и трехкратной иммунизации более существенно активизирует CD16/32, NKT, CD25, MHC II и TLR2 экспрессирующие клетки, также после третьей иммунизации выявлена активность В-лимфоцитов (CD19) и T-regs; ЭБСП после первой и второй иммунизации повышает количество клеток с маркерами CD19, MHC II и TLR2, после первой иммунизации — только численность NKT, CD25 и TLR4.

Таблица 2. Действие вакцины «Стафиловак» (СВ) и внеклеточного белоксодержащего антигена (ЭБСП) после иммунизации мышей на показатели врожденного и адаптивного иммунитета (иммунофенотип МЛ селезенки и Toll-подобные рецепторы)

Показатель	СВ (% клеток, M±SD)				ЭБСП (% клеток, M±SD)			
	7сут после 1 иммунизации		7сут после 3 иммунизации		7сут после 1 иммунизации		7сут после 2 иммунизации	
	СВ	К	СВ	К	ЭБСП	К	ЭБСП	К
CD16/32	18,2 ±1,5*	10,7 ±0,9	17,2 ±1,7*	10,7 ±0,9	13,1 ±2,1	10,7 ±0,9	13,7 ±1,6	9,3 ±0,8
NKT	4,8 ±0,6*	1,1 ±0,3	6,8 ±0,7*	1,1 ±0,3	3,4 ±0,2*	1,1 ±0,3	2,5 ±0,4	1,2 ±0,5
CD25	13,6 ±1,5*	8,6 ±0,6	15,6 ±2,4*	8,6 ±0,6	14,5 ±1,5*	8,6 ±0,6	12,7 ±0,6	8,2 ±0,4
T-reg	2,2 ±0,5	2,7 ±0,4	5,2 ±0,7*	2,7 ±0,4	3,3 ±0,4	2,7 ±0,4	3,9 ±0,4	2,2 ±0,5
CD19	11,9 ±1,3	9 ±0,4	15,4 ±1,5*	9 ±0,4	18,1 ±2,1*	9 ±0,4	17,5 ±1,7*	9,6 ±0,5
MHC II	46,2 ±4,4*	23,4 ±2,7	55,2 ±4,8*	23,4 ±2,7	54,9 ±4,7*	23,4 ±2,7	48,1 ±3,2*	21,8 ±2,9
TLR2	14,3 ±1,5*	7,1 ±0,6	12,3 ±1,3*	7,1 ±0,6	12,8 ±0,9*	7,1 ±0,6	13,8 ±1,5*	6,1 ±0,7
TLR4	6,1 ±0,6	6,4 ±0,5	6,6 ±0,7	6,4 ±0,5	4,6 ±0,4	6,4 ±0,5	5,4 ±0,6*	2,4 ±0,6

Примечание: *p<0,05 — достоверность различий по критерию Стьюдента и Вилкоксона; показатели CD3, CD4, CD8a и γΔT — без динамики при использовании обоих препаратов.

При изучении фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей в ответ на однократное введение препаратов более высокая активность установлена при введении СВ. Так, при введении СВ отмечены наиболее высокие значения фагоцитарного индекса (ФИ) как через 1 сутки после иммунизации ($84,3 \pm 4,2$), так и через 7 суток ($88,4 \pm 3,9$) при $60,2 \pm 3,1$ в контроле; фагоцитарное число (ФЧ) максимально нарастало через 7 суток ($7,2 \pm 0,7$) при $5,1 \pm 0,4$ — в контроле; индекс бактерицидности фагоцитов (ИБФ) повышался через 1 сутки $-77,3 \pm 2,7$ при $57,3 \pm 3,7$ — в контроле; при введении ЭБСП отмечено значимое увеличение только ФЧ через 7 суток после иммунизации — $6,8 \pm 0,4$ при $5,3 \pm 0,6$ в контроле.

Таким образом, наиболее длительная активация фагоцитоза отмечается под действием СВ, в то время как ЭБСП показывает более кратковременное и позднее стимулирующее действие на фагоцитоз.

Изучение протективной активности двух типов изучаемых препаратов — вакцины «Стафиловак», приготовленной по усовершенствованной технологии, и внеклеточных экспериментальных белоксодержащих препаратов в опытах активной защиты показало их сравнимость (табл. 3). Остановившись на протективной активности вакцины «Стафиловак», которую изучали при шестикратной иммунизации (3 п/к и 3 в/бр) в разовой дозе 500 мкг следует отметить, что как у экспериментальной серии СВ, при в/бр заражении беспородных мышей высоковирулентным штаммом *S. aureus* № 6, так и у двух производственных серий при заражении мышей линии BALB/c менее вирулентным штаммом *S. aureus* № 1986 отмечены высокие индексы эффективности: соответственно, ИЭ 11,0 — 2,45 — 2,63.

Протективный эффект внеклеточных экспериментальных белоксодержащих препаратов изучали при двукратной п/к иммунизации в дозе 1,2 мкг белка и заражении мышей линии BALB/c высоковирулентным штаммом *S. aureus* № 6 в ретроорбитальный синус (этот путь заражения близок к внутривенному), что может привести к развитию инфекционного процесса в течение как минимум 10 суток, а не только к интоксикации на 3-5 сутки. Полученные результаты свидетельствуют о высокой протективной активности ЭБСП: ИЭ у двух серий 4,28 и 4,25.

Следует отметить, что как СВ, так и ЭБСП: повышали уровень специфических IgG в сыворотках иммунизированных животных, соответственно, в 2,6-3,0 и 2,2-2,5 раза; обладали протективной активностью, установленной также в опытах пассивной защиты мышей: кроличьи и мышьи сыворотки от животных, иммунизированных СВ, защищали, соответственно, 100 и 70% мышей, зараженных 10^9 м.к. *S. aureus* 1986, а иммунизированных ЭБСП защищали до 70% мышей, зараженных $2,5 \times 10^7$ м.к. *S. aureus* 6; оба препарата снижали высеваемость *S. aureus* из крови, селезенки и почек иммунизированных мышей, что было показано на разработанной модели генерализованной стафилококковой инфекции [1].

Проведенные исследования подтвердили полученные ранее данные о том, что если при выделении поверхностных антигенов клеточной стенки наиболее иммуногенным оказался менее вирулентный шт. *S. aureus* №1991, то поверхностные антигены, выделенные из самого вирулентного из изученных шт. №6, были не способны защитить от заражения даже гомологичным штаммом. В то же время, при выделении внеклеточных белоксодержащих антигенов именно этот вирулентный штамм *S. aureus* №6 оказался наиболее перспективным.

При изучении влияния на показатели врожденного и адаптивного иммунитета установлено, что оба препарата вызвали повышение численности TLR2 экспрессирующих клеток (что свидетельствует о наличии в антигенных препаратах патоген-ассоциированных молекулярных структур — PAMP) и клеток с молекулами антигенного представления МНС II (поздний маркер активации клеток). При этом введение СВ вызывало и после 1, и после 3 иммунизации повышение количества клеток с маркером CD25, отражающим раннюю активацию иммунокомпетентных клеток, а иммунизация ЭБСП приводила к более кратковременному повышению числа этих клеток. С другой стороны, выявлялось более продолжительное нарастание количества В-лимфоцитов (CD19) при иммунизации ЭБСП. Также установлено, что наиболее длительная активация фагоцитоза отмечается под действием СВ, в то время как ЭБСП показывает более кратковременное и позднее стимулирующее действие на фагоцитоз.

Таблица 3. Протективная активность вакцины «Стафиловак» (СВ) и внеклеточных экспериментальных белоксодержащих препаратов (ЭБСП) при разных способах заражения

№	Иммунизирующий препарат			Заражающий штамм S aureus, способ заражения			Эффект (пало/ всего заражено мышей)	По сравнению с контролем	LD ₅₀ × 10 ³	ИЭ
	название серия	кратность, способ	позовая доза	№	в/бр, р/о	доза х 10 ³ м.к				
1	СВ эксп	Зп/к+Зв/бр	500 мкг	6	в/бр	0,4 2,0 10,0 0,4 2,0 10,0	1/10 4/10 8/10 8/10 10/10 10/10	χ ² =15,1 p=0,001	2,75 0,25	11,0
2	СВ с.2 (производст)	Зп/к+Зв/бр	500 мкг	1986	в/бр	1,25 2,5 5,0 10,0	0/10 4/10 9/10 10/10	χ ² =9,3 p=0,002	2,87	2,45
	СВ с.3 (производст)					1,25 2,5 5,0 10,0	0/10 5/10 8/10 9/10	χ ² =10,6 p=0,001	3,08	2,63
	К					1,25 2,5 5,0 10,0	8/10 9/10 9/10 10/10		1,17	
3	ЭБСП с.1	2п/к	1,2 мкг белка	4	р/о	0,4 2,0 10,0	0/10 2/10 9/10	χ ² =5,41 p<0,05	3,81	4,28
	К					0,4 2,0 10,0	4/10 6/10 10/10		0,89	
4	ЭБСП с.2	2п/к	1,2 мкг белка			0,4 2,0 10,0	0/10 1/10 7/10	χ ² =5,55 p=0,018	6,17	4,25
	К					0,4 2,0 10,0	2/10 5/10 10/10		1,45	

Примечание. * Исследование №1 проведено на беспородных мышах. Контроль — интактным мышам вводили 0,9% раствор натрия хлорида; п/к — подкожно, в/бр — внутривенно, р/о — в ретроорбитальный синус; СВ эксп — экспериментальная серия «Стафиловак»; СВ с.2 и с.3 — производственные серии СВ, изученные в процессе доклинических исследований; ИЭ — отношение LD₅₀ иммунизированных мышей к LD₅₀ контрольных (неиммунизированных).

Совокупность полученных результатов свидетельствует, что два типа антигенных препаратов — вакцина «Стафиловак» на основе антигенов клеточной стенки и внеклеточные экспериментальные белоксодержащие препараты сопоставимы по иммунобиологическим свойствам и активируют эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета. Анализ данных показывает, что вакцина «Стафиловак» обладает наиболее стимулирующим влиянием на дифференцировку лимфоцитов, чем ЭБСП. Но при этом ЭБСП демонстрирует активирующее влияние на клетки более продолжительное время, в особенности на В-лимфоциты, по сравнению со «Стафиловак», являющиеся продуцентами антител. Это позволяет считать, что экспериментальные белоксодержащие препараты более интенсивно действуют на адаптивный иммунитет. «Стафиловак», напротив, является стимулятором врожденного иммунитета, так

как в большей мере индуцирует фагоцитарную активность макрофагов и нарастание численности клеток-эффекторов, отвечающих за врожденные иммунные реакции. Возможно, что суммирование действия этих антигенов стафилококка позволит повысить эффект лечебного и профилактического действия каждого антигена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асташкина Е.А. Внеклеточные белоксодержащие антигены *Staphylococcus aureus* и их иммуно-биологические свойства. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 2017.
2. Грубер И.М., Доненко Ф.В., Асташкина Е.А., Игнатова О.М., Егорова Н.Б., Ванесова Н.П., Черкасова Л.С., Тарасова О.Е., Киселевский М.В. Способ получения протективной белок-содержащей фракции бактерий. Патент РФ на изобретение № 2533815 от 20.11.2014.
3. Грубер И.М., Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Михайлова Н.А. Стратегия разработки противостафилококковых иммунопрофилактических и иммунотерапевтических препаратов. Эпидемиол. и инфекцион. болезни. Актуальные вопросы. 2013; 4: 31-38.
4. Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В. и др. Этиология инфекционного эндокардита в России. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2015; 17(1): 4-10.
5. Егорова Н.Б., Ефремова В.Н., Курбатова Е.А., Грубер И.М. Экспериментальная и клинико-иммунологическая оценка бесклеточной стафилококковой вакцины «Стафиловак». Журн. микробиол. 2008; 6: 102-108.
6. Ефремова В.Н., Егорова Н.Б., Масюкова С.А. Бесклеточная антистафилококковая вакцина для лечения хронической стафилококковой инфекции. Патент РФ на изобретение № 2122862 от 10.12.1998.
7. Корзая Л.И. Исследование иммунологических свойств комплекса водорастворимых антигенов, полученного из разных штаммов стафилококка. Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 1982.
8. Курбатова Е.А. Разработка поликомпонентной вакцины из антигенов условно-патогенных микроорганизмов (экспериментальное и клинико-иммунологическое исследование). Дис. докт. мед. наук. М., 1997.
9. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология: Учебник. М., Медицина, 2010.
10. Burlak C., Hammer C.H., Robinson M.A. et al. Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. Cell Microbiol. 2007; 9: 1172-1190.
11. Daum R.S. *Staphylococcus aureus* vaccines. Руководство «Vaccines». S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, P.A. Offit. Vaccines, Saunders Elsevier, 2008.
12. Mohamed N., Wang M.Y. et al. Vaccine development to prevent *Staphylococcus aureus* surgical-site infections. British J. of Surgery. 2017; 104(2): e41-54.
13. Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Annu Rev. Microbiol. 2010, 64: 143-162.
14. Sibbald M.J., Ziebandt A.K., Engelmann S. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006. 70(3): 755-788.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

М.К.Гулимов¹, Л.Р.Романцова¹, А.В.Астапенко¹, Ю.Р.Щетинина¹, Е.В.Прокофьева¹, Г.В.Мовсесян¹, В.В.Зверев^{1,2}, Ю.И.Аммур¹

ВЛИЯНИЕ АУТОФАГИИ НА РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА КРАСНУХИ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Цель. Данное исследование направлено на изучение роли аутофагии во внутриклеточном цикле вируса краснухи. **Материалы и методы.** Для того, чтобы оценить взаимосвязь процесса аутофагии и репликации вируса краснухи, эпителиальные клетки A549 заражали диким и аттенуированным вариантами штамма вируса краснухи — C-77w и C-77a, соответственно, со множественностью заражения 1 инф.ед./кл, параллельно измеряли накопление вирусной РНК и уровень экспрессии генов, участвующих в инициации и элонгации аутофагосомы и ее слиянии с лизосомой — Beclin1, Atg5, Rab7 и SQSTM1 (p62), а также в присутствии ингибитора (BFLA) и индуктора (Rapamycin) аутофагии. **Результаты.** Для мРНК генов Beclin1 и Atg5 была характерна их повышенная экспрессия на 24-48 (для дикого штамма) и 24-72 (для аттенуированного

штамма) часов после заражения. Однако индукции экспрессии мРНК генов Rab7 и SQSTM1 не наблюдали. Данный эффект коррелировал с более отсроченной экспрессией IFN β , а также IFN β -опосредованной индукцией экспрессии мРНК про-апоптотических генов. Кроме того, аутофагия вносила существенный вклад в продукцию вирусных частиц клетками A549 во внеклеточное пространство, что следует из увеличения их выхода через 48 часов после заражения клеток A549 в присутствии индуктора аутофагии и незначительного снижения — в присутствии ингибитора, при этом значимого эффекта на изменение концентрации вирусной РНК как в супернатантах, так и внутриклеточно не наблюдали. *Заключение.* Таким образом, мы предполагаем, что вирус краснухи может избирательно регулировать процесс аутофагии путем стимулирования инициации и подавления более поздних стадий для предотвращения деградации вирусного потомства и обеспечения своей репликации.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 36—42

Ключевые слова: вирус краснухи, аутофагия

M.K.Gulimov¹, L.R.Romantsova¹, A.V.Astapenko¹, Yu.R.Schetinina¹, E.V.Prokofeva¹, G.V.Movsesyan¹, V.V.Zverev^{1,2}, Yu.I.Ammur

AUTOPHAGY REGULATION BY RUBELLA VIRUS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Some viruses can subvert host defense mechanism, autophagy, to their own benefit. We analysed the effect of Rubella virus (RV) infection on autophagy in human alveolar epithelial cells A549. *Materials and methods.* Cells were infected with the wild type and lab-attenuated strain, C-77w and C-77a, respectively, with a multiplicity of infection of 1.0, in parallel, the expression level of genes encoding Beclin1, Atg5, Rab7, and p62 (SQSTM1) proteins participating in different steps of autolysosome formation was measured. To investigate the role of autophagy on RV replication cycle, we measured the amount of infectious RV particles, together with the viral RNA in supernatants and cell lysates, after incubation of A549 cells with wild type or attenuated strain in the presence of the autophagy inhibitor, Bafilomycin A1, or inducer, Rapamycin. *Results.* The significant increase in Beclin1 and Atg5 gene expression at 24-48 (for the wild type) and 24-72 (for the attenuated type) hours after infection was observed, while significant induction of either Rab7 or SQSTM1 gene expression was not noticed. This effect was correlated with more delayed increase of IFN β expression and IFN β -mediated pro-apoptotic gene expression leading to apoptotic cell death 72-96 hours after infection. Moreover, Bafilomycin A1 diminished the RV infection non significantly, as evidenced by the RT-qPCR and plaque assay, while Rapamycin increased the amount of infectious RV particles released by the infected cells more dramatically with wild type comparing with attenuated strain. *Conclusion.* Thus, we hypothesized that RV can use an antiviral mechanism to prevent degradation and ensure its replication, differentially regulating the process of autophagy, by stimulating the initiation and suppression of later steps.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 36—42

Key words: rubella virus, autophagy

ВВЕДЕНИЕ

Аутофагия — это эволюционно сложившийся клеточный автономный катаболический и защитный механизм, посредством которого клетки способны утилизировать собственные органеллы, макромолекулы и патогены [5]. Аутофагия сложный процесс, в котором участвует более 30 различных белков, задействованных на разных стадиях и выполняющих определенные функции.

Инициация аутофагии происходит при слиянии белков Vps34 и Beclin1 под контролем mTORC1 (Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1) и активации комплекса белков ATG9, ATG18 и ATG2, перемещающихся в цитоплазме на мембрану эндоплазматического ретикулума (ЭПР), где они принимают участие в образовании небольших выступов мембраны, так называемых омегасом [4].

Достраивание до аутофагосомы происходит во время стадии элонгации, где ключевая роль принадлежит двум комплексам генов: Atg12—Atg5, кодирующему белки Atg5/Atg12/Atg16L, и Atg8/LC3, кодирующему белки LC3-I (light chain 3-I) и LC3-II, обеспечивающих элонгацию. Кроме того, белок LC3-II вовлечен в перенос в аутофагосомы белков-адаптеров, в том числе p62, посредством которых впоследствии происходит избирательная доставка различных макромолекул для их деградации (например, вирусных частиц) [9, 11].

Аутофагосомы созревают в аутолизосомы последовательным слиянием аутофагосомы с лизосомами с помощью ГТФазы Rab7 путем эндоцитоза, что приводит к утилизации содержащихся в ней макромолекул гидролазами и другими лизосомальными ферментами с целью получения энергии или уничтожения чужеродных агентов для защиты организма [6].

При вирусной инфекции аутофагия может выполнять функцию механизма надзора, который поставляет вирусные белки в лизосомальные компартменты [5], однако многие РНК-вирусы могут регулировать процесс аутофагии, препятствуя активации дцРНК-зависимых защитных механизмов [15]. Так, известно, что многие РНК-вирусы способны нейтрализовать или использовать аутофагический процесс с целью изменения клеточной физиологии и метаболизма в пользу облегчения собственной репликации [7]. Создание вирусных фабрик из мембранных внутриклеточных органелл имеет важное значение для размножения РНК-вирусов, накапливающих в качестве репликативных промежуточных продуктов дцРНК в своем жизненном цикле [15]. Было показано, что некоторые РНК-вирусы активируют сигнальный путь класса I PI3K/Akt, регулируя аутофагический процесс с целью обеспечения защитной среды для поддержания своей репликации и предотвращения аутофагической деградации вирионов потомства [3, 10, 15]. Так, вирусы Коксаки В3 [3], Зика [10], Денге [8] и, возможно, вирус краснухи, могут захватывать аутофагические мембраны для создания репликационных комплексов, а также блокировать последующие фазы аутофагии и, таким образом, скрываться от последующей элиминации [3]. Таким образом, точное распознавание уникальных молекулярных стратегий, участвующих в биогенезе мембранных вирусных фабрик, имеет решающее значение для лучшего понимания инфекций и идентификации новых терапевтических целей.

Краснуха — острое вирусное заболевание, актуальность и социальная значимость которого обусловлена способностью вируса краснухи вызывать у женщин во время беременности *серьезную фетопатию* — *синдром врожденной краснухи*, нередко заканчивающуюся выкидышем или рождением ребенка с различными тяжелыми пороками развития, такими как слепота, глухота, врожденные пороки сердца [12]. Однако молекулярный механизм тератогенного эффекта, вызванного вирусом краснухи, еще полностью не известен. Известно, что вирус краснухи способен активировать клеточные пролиферативные пути, такие как Ras/Raf/MEK/ERK и PI3K/Akt, регулирующие, кроме того, большую часть мембранного трафика и аутофагию, нарушать цитоскелет и модулировать клеточную гибель [13, 14]. Медленное размножение вируса краснухи связано с внутриклеточной эндомембранной системой — вирус краснухи проникает в клетку-хозяина при помощи эндоцитоза. Вирусная оболочка сливается с эндосомальной мембраной, после декапсидации в цитоплазме начинается образование комплексов репликации вируса краснухи — сферул, захватывающих небольшой участок ЭПР и митохондрии, которые обеспечивают защитную среду для репликации вирусной РНК. Как было показано ранее на модели чувствительной культуры клеток кролика SIRC, вирус краснухи замедляет процесс аутофагии, подавляя уровень конъюгации Atg12—Atg5 и ослабляя LC3В липидизацию, а также снижает среднее количество и размер аутофагосом в клетке [13, 14]. Вместе, эти данные свидетельствуют о том, что в процессе репликации вирус краснухи способен подавлять аутофагию, не вызывая полного ее блока и, вероятно, приводя к апоптозу. Таким образом, мы предполагаем, что вирус краснухи может дифференциально регулировать последовательность аутофагии в своих интересах. Нашей задачей было оценить взаимосвязь процесса аутофагии и репликации вируса краснухи в эпителиальных клетках A549.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований из музея ФГБУ НИИВС имени И.И. Мечникова были получены ампулы с вирусом краснухи штамма С-77 на 5 (С-77w) и 38 (С-77a) пассажах, а также штамма Wistar RA 27/3 на 30 пассаже. Перевиваемые культуры клеток почки кролика (линия RK-13) и линии Vero были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Перевиваемая культура клеток карциномы легкого A549 была предоставлена Никоновой А.А. (НИИВС им. И.И. Мечникова).

Перевиваемые клеточные линии RK-13, Vero, A549 культивировали в питательных средах RPMI 1640 (Gibco, США), MEM (Gibco) или DMEM (Gibco), соответственно, в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, HyClone, США), 1мМ глутамина (Gibco) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco) при температуре +37°C в атмосфере 5% CO₂. При получении монослоя клеток проводили пересев культуры.

За день до заражения клетки A549 высаживали из расчета 2×10^6 в 6-луночный планшет (Greiner Bio-One, Австрия), непосредственно перед заражением 80–90% клеточный монослой промывали раствора Хэнкса (Gibco) и инкубировали с соответствующим вирус-содержащим материалом со множественностью заражения (MOI) 1.0 инфекционная частица на клетку в течение 3 часов при 35°C в атмосфере 5% CO₂, затем удаляли вирусный материал и культивировали зараженные клетки в 3.0 мл питательной среды DMEM с 2% ЭТС на лунку при 33 °C (С-77a) или 37 °C (С-77w) в атмосфере 5 % CO₂. Клеточный монослой лизировали, используя 300 мкл лизирующего буфера RLT RNAeasy kit (Qiagen, Германия) на лунку через 0, 24, 48, 72 и 96 ч после заражения. Лизаты клеток центрифугировали при 1 000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант хранили при -70 °C до использования.

Аналогично проводили эксперименты, добавляя к культуре клеток ингибитор (Bafilomycin A1, BFLA, Sigma Aldrich, USA) или индуктор (Rapamycin, Sigma Aldrich, USA) аутофагии в конечной концентрации 100 нМ каждый за час непосредственно перед заражением.

Титрование вируса краснухи по реакции цитопатического действия (ЦПД) проводили в 96-луночном планшете (Greiner Bio-One) в культуре клеток RK-13. Клетки трипсинизировали, считали в камере Горяева и пересаживали на планшеты с плотностью $1.5-3 \times 10^4$ на лунку в 100 мкл среды. Готовили 10-кратные серийные разведения вирусных образцов в среде без добавления ЭТС. Использовали 6 лунок на 8 разведений каждого вирусного образца. В каждую лунку добавляли 100 мкл разведений вируса краснухи. Планшеты инкубировали при 32-37 °C при 5% CO₂ в течение 10-12 дней. Учет результатов проводили через 8-12 суток. Титры вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lgТЦД₅₀/мл.

Тотальную РНК выделяли из клеточных лизатов с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) согласно инструкции производителя или фенол-хлороформной экстракцией. Очищенную РНК элюировали с мембраны колонок RNeasy Mini Spin дважды 50 мкл воды, не содержащей РНКаз, и оценивали концентрацию РНК на приборе NanoDrop 8 000 (Thermo Scientific, Германия). Примесь ДНК удаляли обработкой ДНКазой 20 U (Синтол, Россия) в течение 30 мин.

При определении уровня экспрессии целевых генов 1 мкг тотальной РНК инкубировали при 42°C в течение 1 ч со следующими компонентами: 1 ед. обратной транскриптазы RevertAid H Minus (Thermo Scientific), 5 мкМ случайных гексамеров или праймера oligo(dT) (Синтол, Россия), 5-кратный буферный раствор (250 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl₂, 50 мМ DTT), 1 мМ каждого dNTP и 20 ед. ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo Scientific). Фермент инактивировали прогреванием реакционной смеси при 70 °C в течение 10 мин.

Аmplификацию с использованием ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл, содержащем 2.5SYBR® Green PCR Master Mix (Синтол), по 200 нМ прямого и обратного праймера для каждого анализируемого гена и 10–50 нг кДНК в двух повторях. ПЦР проводили на приборе DTrime5 (ДНК-технология, Россия): 15 мин при

95 °С, 40 циклов по 15 с при 95 °С и 30 с при 60 °С. Праймеры были подобраны в программе Primer 3 plus. Расчет уровня экспрессии генов проводили, используя $\Delta\Delta Ct$ -метод: средние значения полученных пороговых циклов для каждого исследуемого гена нормализовали относительно значений пороговых циклов, полученных для генов «домашнего хозяйства»: GAPDH, PGK1 и ACTB, которые анализировали параллельно для каждого образца (ΔCt), результаты представляли как кратность изменения (FC) между нормализованными значениями пороговых циклов зараженной культуры клеток непосредственно перед заражением (0 ч) ($\Delta\Delta Ct$) для каждой временной точки (24, 48, 72 и 96 ч).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того, чтобы определить, является ли инициированная аутофагия следствием репликации вируса краснухи, эпителиальные клетки человека A549 заражали диким или аттенуированным вариантами штамма вируса краснухи — C-77w и C-77a, соответственно, полученными и полностью секвенированными ранее в нашей лаборатории [1], а также штаммом сравнения Wistar RA27/3 со множественностью заражения 1 инф.ед./кл. Кинетику репродукции вируса в клетках отслеживали по накоплению вирусной РНК внутриклеточно через 24, 48, 72 и 96 ч после заражения с помощью метода ОТ-ПЦР-РВ. На рис. 1 представлено накопление геномной РНК вируса краснухи в культуре клеток A549. Как видно из рис. 1, количество вирусной РНК всех использованных штаммов вируса постепенно растет в культуре зараженных клеток, что свидетельствует о чувствительности данной культуры клеток к вирусу.

Одновременно в этих же клетках был измерен уровень экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в инициации, элонгации и образовании аутофагосомы — Beclin1, Atg5, Rab7 и SQSTM1 (p62). Наибольший уровень экспрессии мРНК генов

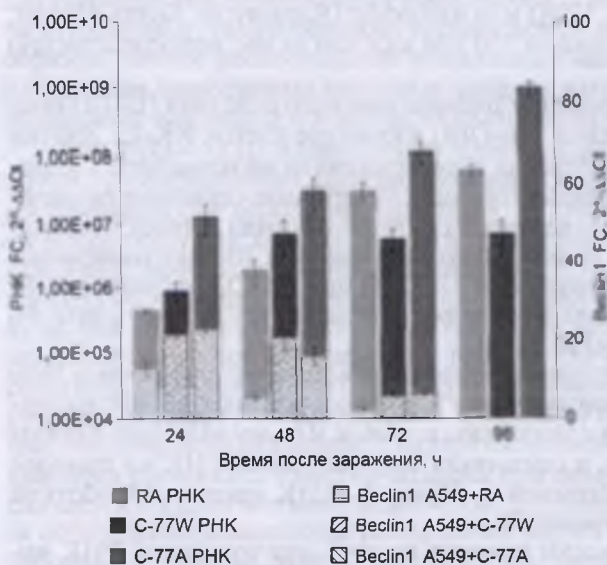


Рис. 1. Накопление РНК вируса краснухи (левая шкала) штамма Wistar RA27/3 (RA) и штамма C-77 дикого (C-77W) и аттенуированного вариантов (C-77A), а также экспрессия мРНК белка Beclin1 (правая шкала) в культуре клеток A549 через 24–96 ч после ее заражения вирусом краснухи штаммами — Wistar RA27/3 или C-77 дикого и аттенуированного варианта. Здесь и на рис. 2 результаты представляют кратность изменения (FC) между нормализованными значениями пороговых циклов (ΔCt) зараженной культуры клеток непосредственно перед заражением (0 ч) ($\Delta\Delta Ct$) для каждой временной точки.

Beclin1 (рис. 1) и Atg5 (рис. 2) был отмечен через 24–48 (для C-77w) и 24–72 (для C-77a) ч после заражения диким и аттенуированным вариантами вируса краснухи, соответственно. Однако, индукции экспрессии мРНК генов Rab7 и SQSTM1 после заражения культуры клеток как диким, так и аттенуированными вариантами вируса краснухи не наблюдали. Таким образом, мы предполагаем, что вирус краснухи может дифференциально регулировать последовательность аутофагии, стимулируя инициацию и подавляя более поздние стадии, в результате не происходит слияние аутофагосомы с лизосомой, что позволяет вирусу использовать антивирусный механизм в своих интересах.

Кроме того, экспрессия генов Beclin1 и Atg5 через 24–48 ч после заражения культуры клеток A549 диким вариантом вируса краснухи и через 24–72 ч аттенуированным вариантом вируса обратно коррелировала с экспрессией мРНК IFN β на 48 и 72 ч после заражения (рис. 2), соответственно, т.е.

более отсроченной (на 24 ч) при заражении аттенуированным вариантом по сравнению с диким. Мы предполагаем, это может быть вызвано выходом собранного вирусного материала потомства и вирусных частиц, включая промежуточные формы дРНК, опосредованно инициирующие экспрессию IFN β , из «репликационных фабрик» в омегасомах, где происходила их сборка. В дальнейшем экспрессия IFN β приводила к апоптотической гибели зараженных клеток начиная с 96 ч после заражения вследствие, в том числе, активации экспрессии интерферон-зависимых генов, в частности, таких как TNFSF10 (TRAIL) и XAF1, 2,5-5,0-кратное повышение экспрессии которых определяли через 72 ч после заражения. При этом значимой разницы в индукции экспрессии мРНК про-апоптотических генов в культуре клеток A549 при ее заражении диким или аттенуированным вариантами штамма C-77 вируса краснухи не было установлено. Однако при заражении диким вариантом штамма C-77 экспрессия мРНК гена Atg5 снижалась ранее (уже через 48 ч после заражения), приводя к более ранней экспрессии мРНК IFN β , по сравнению с аттенуированным вариантом (рис. 2), при этом накопление РНК дикого варианта вируса в культуре клеток A549 замедлялось уже через 48 ч после ее заражения (рис. 1), что, возможно, указывает на ключевую роль Atg5 в процессе взаимодействия вируса краснухи и аутофагии. Важно также отметить, что по литературным данным способность вируса краснухи индуцировать апоптоз варьирует в зависимости от штамма вируса и типа инфицированных им клеток [2]. Кроме того, интересен тот факт, что вирус краснухи способен активировать множественные апоптотические пути, однако насколько этот вирус влияет на механизмы запрограммированной гибели и микроокружения зараженной клетки до сих пор неизвестно.

Для подтверждения участия аутофагии в процессе репликации вируса краснухи, мы измерили концентрацию вирусных частиц в супернатантах, а также РНК вируса краснухи внутриклеточно в присутствии ингибитора (BFLA) или индуктора (Рапамицин) аутофагии при заражении культуры клеток A549 штаммом C-77 вируса краснухи через 48 часов после заражения. Основным регулятором аутофагии является протеинкиназа mTOR, состоящая из двух отдельных мультипротеиновых комплексов mTORC1 и mTORC2, схожих по своим компонентам, регуляции, функциям, но влияние на аутофагию оказывает непосредственно mTORC1 [5]. Протеинкиназа mTORC1 чувствительна к действию рапамицина, который ингибирует ее, инициируя процесс аутофагии [10]. BFLA блокирует аутофагию на стадии слияния аутофагосомы с лизосомой, тем самым препятствуя элиминации патогена [3]. Установлено, что аутофагия вносила существенный вклад в продукцию вирусных частиц клетками A549, что следует из увеличения их выхода в супернатант в присутствии индуктора аутофагии и незначительного снижения в присутствии ингибитора, при этом значимого эффекта на изменение концентрации вирусной РНК через 48 часов после заражения не наблюдали, что свидетельствовало о том, что вирус краснухи, по-видимому, использует индуцированную аутофагию для облегчения сборки вирионов потомства, а не для репликации РНК. Следует отметить, что наши результаты не воспроизводят ранее опубликованные данные, полученные группой венгерских ис-

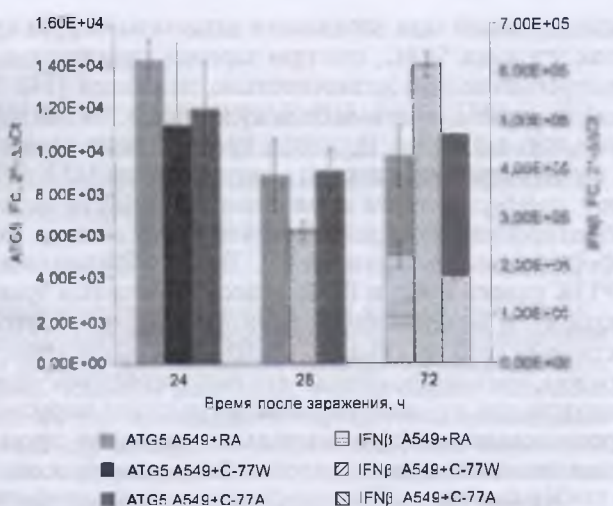


Рис. 2. Экспрессия мРНК белков ATG5 (левая шкала) и IFN β (правая шкала) через 24-72 ч после заражения культуры клеток A549 вирусом краснухи штаммами Wistar RA2/73 (RA) или C-77 дикого (C-77W) и аттенуированного варианта (C-77A).

следователей при заражении штаммом вируса краснухи To336 эпителиальных клеток кролика SIRC, где при заражении клеток в присутствии индуктора аутофагии вирусный выход незначительно снижался [14]. Вероятно, это связано с использованием разных штаммов и культур клеток. В любом случае, влияние аутофагии на продукцию вируса краснухи требует дальнейшего изучения.

Широко известно, что пути Ras/Raf/MEK/ERK и I класса PI3K/Akt препятствуют аутофагии путем активации mTORC1. В свою очередь, класс III PI3K оказывает противоположное действие, что имеет важное значение для инициации аутофагии и формирования омегасом [5]. Таким образом, взаимодействуя с Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K класса I/Akt и PI3K класса III ветвями трансдукции сигнала, возможно, вирус краснухи может избирательно регулировать аутофагический каскад с последующей стимулирующей инициацией и сильным подавлением более поздних этапов. Таким образом, мы предполагаем, что вирус краснухи может использовать антивирусный механизм для предотвращения деградации вирусного потомства и обеспечения своей репликации, дифференциально регулируя процесс аутофагии путем стимулирования инициации и подавления более поздних стадий.

Кроме того, известно, что процесс аутофагии принимает участие в некоторых фазах онтогенеза и органогенеза. Так, исследования показали, что аутофагия играет важную защитную роль в морфогенезе сердца и нервной системы при развитии позвоночных животных [13]. В свете этих наблюдений, актуально предположить, что аутофагия, опосредованная вирусом краснухи, может принимать участие в патогенезе пороков развития органов при синдроме врожденной краснухи. Таким образом, вероятно, терапевтические способы таргетинга процесса аутофагии могут помочь уменьшить тяжелые последствия синдрома врожденной краснухи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев Г.В., Борисова Т.К., Файзулов Е.Б., Забияка Ю.И., Десяткова Р.Г., Зверев В.В. Изучение молекулярных механизмов аттенуации вируса краснухи на примере отечественного штамма С-77. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012, 27(3): 28-34.
2. Adamo M.P., Zapata M., Frey T.K. Analysis of gene expression in fetal and adult cells infected with rubella virus. *Virology*. 2008, 370(1): 1-11.
3. Chang H., Li X., Cai Q. et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway is involved in CVB3-induced autophagy of HeLa cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017, 40(1): 182-192.
4. Delgado M., Singh S., De Haro S. et al. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunological Reviews*. 2009, 227(1): 189-202.
5. Deretic V., Levine B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. *Cell Host Microbe*. 2009, 5(6): 527-549.
6. Jager S., Bucci C., Tanida I. et al. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*. 2004, 117(20): 4837-4848.
7. Jordan T.X., Randall G. Manipulation or capitulation: virus interactions with autophagy. *Microbes and Infection*. 2012, 14(2): 126-139.
8. Heaton N.S., Randall G. Dengue Virus-Induced Autophagy Regulates Lipid Metabolism. *Cell Host Microbe*. 2010, 8 (5): 422-432.
9. Lamark T., Svenning S., Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays in Biochemistry*. 2017, 61(6): 609-624.
10. Liang Q., Luo Z., Zeng J. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem. Cell*. 2016, 19 (5): 1-9.
11. Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M. et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008, 451(7182): 1069-1075.
12. Nazme N.I., Hussain M., Das A.C. Congenital Rubella Syndrome — A Major Review and Update. *Delta Med. Col. J*. 2015, 3(2): 89-95.
13. Orosz L., Megyeri K. Well begun is half done: Rubella virus perturbs autophagy signaling, thereby facilitating the construction of viral replication compartments. *Medical Hypotheses*. 2016, 89: 16-20.
14. Pasztor K., Orosz L., Seprényi G. et al. Rubella virus perturbs autophagy. *Med. Microbiol. Immunol*. 2014, 203(5): 323-331.
15. Shi J., Luo H. Interplay between the cellular autophagy machinery and positive-stranded RNA viruses. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2012, 44(5): 375-384.

ПОЛИКОМПОНЕНТНАЯ ВАКЦИНА ИММУНОВАК-ВП-4 И ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Анализ экспериментальных данных и результатов многолетних клинических исследований иммунотерапевтической и иммунопрофилактической эффективности поликомпонентной вакцины Иммуновак-ВП-4. **Материалы и методы.** Для получения вакцины селекционированы иммуногенные штаммы *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, антигены которых обладали широкой внутри- и межвидовой перекрестной протективной активностью. Иммунологические показатели определяли с помощью проточной цитометрии при использовании диагностических моноклональных антител к цитокинам, Toll-подобным рецепторам, поверхностным молекулам дендритных клеток и лимфоцитов. Клинический эффект Иммуновак-ВП-4 оценивали при хронических воспалительных и аллергических заболеваниях, а также при профилактике острых респираторных заболеваний (ОРЗ) в детских организованных коллективах. **Результаты.** Иммуновак-ВП-4 защищала мышей от заражения этиологически значимыми штаммами бактерий и вирусов, способствовала увеличению TLR-2, 4, 9 экспрессирующих клеток; созреванию дендритных клеток; синтезу цитокинов — IL1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ ; пролиферации и усилению цитотоксичности NK-клеток. Отмечен клинический эффект (69,2 — 100)% Иммуновак-ВП-4 при включении в базисную терапию пациентов с хроническими воспалительными и аллергическими заболеваниями. Терапевтический эффект сопровождался положительной динамикой иммунологических показателей, в частности повышением IFN γ и снижением IL-4. Иммунотерапия и иммунопрофилактика при использовании Иммуновак-ВП-4 приводила к снижению числа эпизодов ОРЗ и их бактериальных осложнений, в том числе в детских организованных коллективах. **Заключение.** Иммунологически обоснована целесообразность использования Иммуновак-ВП-4 в комплексном лечении и профилактике бактериальных и вирусных инфекций, вызываемых условно патогенными микроорганизмами, а также при аллергических заболеваниях.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 43—49

Ключевые слова: Иммуновак-ВП-4, условно патогенные микроорганизмы, иммунотерапия, иммунопрофилактика, врожденный иммунитет

N.B.Egorova, E.A.Kurbatova, N.K.Akhmatova, I.M.Gruber

POLYCOMPONENT VACCINE IMMUNOVAC-VP-4 AND IMMUNOTHERAPEUTIC CONCEPT OF ITS USE FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF DISEASES CAUSED BY OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Analysis of experimental data and results of long-term clinical studies of immunotherapeutic and prophylactic effectiveness of a polycomponent vaccine, Immunovac-VP-4. **Materials and methods.** Immunogenic strains of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, which antigens possessed broad intra — and interspecific cross-protective activity were selected to obtain the vaccine. Immunological parameters were determined using flow cytometry with the use of diagnostic monoclonal antibodies to cytokines, Toll-like receptors, surface molecules of dendritic cells and lymphocytes. The clinical effect of Immunovac-VP-4 was evaluated in chronic inflammatory and allergic diseases, as well as in the prevention of acute respiratory diseases (ARI) in children's organized groups. **Results.** Immunovac-VP-4, protected the mice from infection caused by etiologically significant strains of bacteria and viruses, increased TLR-2, 4, 9-expressing cells; maturing the dendritic cells; the synthesis of cytokines IL1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ ; proliferation and increased cytotoxicity of NK cells. Significant clinical effect (69.2 — 100)% of Immunovac-VP-4 on the background of the basic therapy was obtained in patients with chronic inflammatory and allergic diseases. The therapeutic effect was accompanied by a positive dynamics

of immunological parameters, in particular, an increase in IFN γ and a decrease in IL-4. Immunotherapy and immunoprophylaxis using Immunovac-VP-4 led to a decrease in the number of episodes of acute respiratory infections and their bacterial complications, including children in organized groups. *Conclusion.* Immunological feasibility of using Immunovac-VP-4 in complex treatment and prevention of bacterial and viral infections, caused by opportunistic microorganisms, as well as in allergic diseases was proved.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 43—49

Key words: Immunovac-VP-4, opportunistic microorganisms, immunotherapy, immunization, innate immunity

ВВЕДЕНИЕ

Роль условно патогенной микрофлоры в патологии человека возрастает, что связано с трудностями терапии и профилактики этих заболеваний, обусловленных полиэтиологичностью возбудителей и их резистентностью к применяемым химиопрепаратам. Эти факторы практически исключают возможность использования средств специфической профилактики, направленных против отдельных возбудителей, и обосновывают необходимость разработки новых подходов к управлению эпидемическими процессами, вызываемыми условно патогенными микроорганизмами.

За последние десятилетия достигнут значительный прорыв в исследованиях клеточных и молекулярных механизмов иммунитета. Пересмотрены основные представления о роли врожденного иммунитета в реализации резистентности к широкому кругу патогенов, активации адаптивного иммунитета. Установлено, что некоторые бактериальные антигены (липополисахарид, пептидогликан, белковые антигены клеточной стенки и др.) могут быть одним из инструментов программирования и коррекции врожденного иммунитета [1, 13]. Не менее важное значение имеют и современные представления о роли бактериальных антигенов в лечении аллергических заболеваний, основанные на признании ведущей роли иммунных механизмов в патогенезе атопии [10, 15]. Установлена важная роль нарушений в системе врожденного иммунитета, приводящих к формированию IgE-опосредованных аллергических реакций. Особенностью такого генотипа является поляризация иммунного ответа по Th2-типу, что сопровождается снижением содержания Th1 лимфоцитов, снижением синтеза интерферона и его ингибирующего действия на образование IgE.

Достижения иммунологической науки открывают значительные возможности для исследования клеточных и молекулярных механизмов иммунитета. Это, в первую очередь, относится к получению новых знаний о роли врожденного иммунитета в реализации резистентности к широкому кругу патогенов и программированию пути формирования адаптивного иммунитета. Важнейшую роль в осуществлении этих функций врожденного иммунитета играет структура первичного распознавания каждого патогена, что происходит под действием образраспознающих рецепторов (PRRs). Среди PRRs наибольшее внимание исследователей привлекают Toll-подобные рецепторы (TLRs), экспрессируемые эффекторами врожденного иммунитета. После связывания с лигандами TLRs взаимодействуют с клеточными адаптерными молекулами и запускают каскад передачи сигнала Т-лимфоцитам. Важными элементами механизма действия бактериальных лигандов является усиление пролиферации и функциональной активности клеток эффекторов иммунитета. Эффекторные механизмы многофакторны, но ключевыми элементами являются дендритные клетки (DC) и естественные киллеры (NK). DC обеспечивают распознавание, процессинг патогенов и антигенное представление их в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) Т-лимфоцитам. Для осуществления этих функций DC продуцируют цитокины, костимулирующие адгезивные молекулы и молекулы антиген представления. При выполнении этих функций DC обеспечивают взаимосвязь врожденного и приобретенного иммунитета и программируют поляризацию Т-лимфоцитов по Th1 или Th2-типу [14, 15].

Разработанная в НИИВС им. И.И.Мечникова поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4 содержит большой набор РАР, являющихся лигандами для TLRs. Антигены этиологически значимых условно патогенных микроорганизмов, входящие в состав Иммуновак-ВП-4, обладают способностью активировать ключевые эффекторы врожденного иммунитета и внутри- и межвидовую перекрестную протективную активность. Эти качества обеспечивают возможность формирования защиты от полиэтиологического комплекса респираторных заболеваний (ОРЗ), воспалительных заболеваний различной локализации и оказывать положительное влияние на течение аллергических заболеваний.

Цель исследования: анализ экспериментальных данных и результатов многолетних клинических исследований иммунотерапевтической и иммунопрофилактической эффективности поликомпонентной вакцины Иммуновак-ВП-4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4 содержит в своем составе антигены *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* в виде липополисахарида, ассоциированного с белком наружной мембраны указанных трех грамотрицательных микроорганизмов, а также тейхоевых кислот, пептидогликана и белковых антигенов *Staphylococcus aureus*. Для получения вакцины селекционированы наиболее иммуногенные штаммы указанных видов условно патогенных бактерий, антигены которых обладали широкой внутри- и межвидовой перекрестной протективной активностью. Для выделения антигенов использованы шадящие методы выделения антигенов, позволяющие в максимальной степени сохранить их нативную структуру. Вакцина разрешена к применению в практике здравоохранения Министерством здравоохранения и социального развития РФ для назально-подкожного и назально-перорального применения (регистрационное удостоверение от 24.02.2010).

Протективную активность Иммуновак-ВП-4 оценивали в опытах активной защиты мышей от вирулентных штаммов бактерий и вирусов. Иммунологические показатели определяли по морфофункциональным критериям, присущим иммунокомпетентным клеткам, а также с помощью метода проточной цитометрии при использовании диагностических моноклональных антител к цитокинам, Толл-подобным рецепторам, поверхностным молекулам дендритных клеток и лимфоцитов. Клинический эффект Иммуновак-ВП-4 оценивали при хронических воспалительных и аллергических заболеваниях, а также при профилактике острых респираторных заболеваний в детских организованных коллективах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенных экспериментах на мышах выявлено, что под действием Иммуновак-ВП-4 значительно увеличивалось количество экспрессирующих TLR2, TLR4 и TLR9 при разных методах введения вакцины [1, 3]. Прибавление Иммуновак-ВП-4 в среду культивирования DC приводило к их созреванию, что сопровождалось синтезом цитокинов (IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-12); повышением количества клеток, экспрессирующих молекулы CD40, CD80, CD86, CD83 и MHC I и MHC II. При вакцинации мышей Иммуновак-ВП-4 в крови мышей увеличивалось содержание IL1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ . Также показано, что Иммуновак-ВП-4 усиливала пролиферацию и цитотоксическое действие NK-клеток [1].

Наряду с исследованиями механизма иммунитета, осуществленного на молекулярно-клеточном уровне, были поставлены опыты по определению протективной активности Иммуновак-ВП-4 при заражении мышей различными условно патогенными возбудителями. В табл. 1 обобщены результаты исследований по защите от восьми бактериальных и двух вирусных возбудителей. Во всех опытах количество выживших после заражения летальными дозами мышей значительно отличалось от непривитого контроля. Приведенные данные подтверждают, что однократная вакцинация Иммуновак-ВП-4 создает протективный эффект от широкого круга патогенов.

Таблица 1. Протективная активность Иммуновак-ВП-4 при заражении штаммами бактерий и вирусов

Вид возбудителя	Срок заражения после однократной подкожной иммунизации, сутки	Иммунизирующая доза, мкг на мышь	Выжило/Всего после заражения	% выживших
K.pneumoniae	1	200	9/10***	90
	7	-«-	8/10***	80
Контроль		нв	0/10	0
S. aureus	1	200	16/20***	80
	7	-«-	15/20***	75
Контроль		нв	0/20	0
P. vulgaris	1	200	14/20***	70
	7	-«-	20/20***	100
Контроль		нв	0/20	0
E. coli	1	200	17/20***	85
	7	-«-	6/20**	30
Контроль		нв	0/20	0
P. aeruginosa	1	100	13/20**	65
	7	-«-	10/20**	50
Контроль		нв	3/20	15
H. influenzae типа b	1	200	16/20***	80
	8	-«-	9/20***	45
Контроль		нв	0/20	0
S. pneumoniae серотип 3	5	50	27/38***	71
Контроль		нв	0/38	0
Salmonella серовар Typhimurium	1	200	7/10†**	70
Контроль		нв	0/10	0
H. simplex	5	50	9/10††*	90
Контроль		нв	5/10	50
Вирус гриппа H5N2	1	400	8/10*	80
Контроль		нв	1/10	10

Примечание. † — на 5 сутки наблюдения; †† — на 8 сутки наблюдения. Достоверность различий с контролем: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; нв — не вводили. Контроль — интактные (неиммунизированные) мыши, зараженные той же дозой одновременно с опытными мышами.

Таким образом, экспериментальные исследования показали, что Иммуновак-ВП-4 является мощным индуктором эффекторов врожденного иммунитета: вызывает значительную экспрессию TLRs—2, 4, 9; стимулирует DC к созреванию и экспрессии костимулирующих молекул и антигенпрезентирующих молекул CD40, CD80, CD86, CD83, MHC I, MHC II и цитокинов TNF α , IL1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ ; способствует повышению цитокинов в крови иммунизированных мышей (IL1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ); программирует дифференцировку Т-лимфоцитов по Th1-пути; повышает цитоксичность NK-клеток; обладает широкой перекрестной протективной активностью в отношении условно патогенных возбудителей.

В ходе ограниченных и государственных испытаний установлена способность Иммуновак-ВП-4 обеспечивать клинический эффект у детей и взрослых при острых и хронических полиэтиологических респираторных заболеваниях, повышать эффективность базисного лечения гнойно-воспалительных заболеваний органов дыхания, кожи и аллергических заболеваний. У больных, получавших Иммуновак-ВП-4, отмечен стереотипный клинически положительный эффект в пределах 69,2 — 100%, проявляющийся в значительном снижении числа и тяжести рецидивов, улучшении клинических признаков заболеваний, снижении объема принимаемых лекарственных средств, в том числе антибиотиков и глюкокортикостероидов. Важным показателем является также снижение числа ОРЗ и их бактериальных осложнений, в том числе в детских организованных коллективах (табл. 2).

Таблица 2. Клинический эффект Иммуновак-ВП-4

Нозология	Группа	Метод введения	Число привитых	Эффект, %
Заболевания органов дыхания				
ОРЗ, часто болеющие [12]	дети	нп	70	74,0
Хронический бронхит [9]	взрослые	пк	20	95,0
Абсцесс легкого [3]	взрослые	пк	20	75,0
Атопические заболевания				
Бронхиальная астма [7]	взрослые	нпк	26	69,2
Бронхиальная астма [11]	взрослые	нпк	28	82,1
Бронхиальная астма [7]	взрослые	нп	35	88,6
Бронхиальная астма [8]	дети	нп	45	71,1
Атопический дерматит [5]	дети	нп	27	100,0
Латексная аллергия* [6]	взрослые	нп	12	100,0
Другие заболевания				
Герпесвирусная инфекция [2]	взрослые	нп	165	90,0
Пиодермия [4]	взрослые	нпк	59	98,3
Эритемы фигурные [4]	взрослые	нпк		69,56**
Профилактика ОРЗ в детских организованных коллективах [3]				
Привитые	дети	нп	89	13,5***
Непривитые	дети	нв	60	41,6***

Примечание. * без базисной терапии. Наблюдение в течение 1 года и более. ** стойкая клиническая ремиссия, *** наблюдение в течение 14 месяцев. Представлен процент часто болеющих детей дошкольного возраста в привитых и непривитых группах; нп — назально-перорально, пк — подкожно, нпк — назально-подкожно, нв — не вводили.

Один курс профилактического введения Иммуновак-ВП-4 в детских организованных коллективах оказывал длительный профилактический эффект (14-месячный срок наблюдения) на заболеваемость ОРЗ, что проявлялось в снижении числа эпизодов ОРЗ, снижении числа часто болеющих детей, уменьшении бактериальных осложнений (отит, бронхит, гайморит, ангина) [3]

Было проведено также два исследования, в которых наблюдение за детьми проводили в течение семи месяцев. В этот срок из 138 привитых повторные эпизоды ОРЗ были только у одного ребенка, а бактериальные осложнения у двух детей, тогда как в группах непривитых (168 детей) было 10 и 13 детей с повторными эпизодами и 20 детей с бактериальными осложнениями (отит, бронхит). Представленные данные свидетельствуют о значительном профилактическом эффекте действия Иммуновак-ВП-4 на заболеваемость ОРЗ в детских коллективах [3]. В трех последовательно проведенных контролируемых исследованиях получены практически однозначные результаты: снижение числа и длительности течения эпизодов ОРЗ; предупреждение развития повторных эпизодов ОРЗ, в том числе в младших возрастных группах; снижение числа бактериальных осложнений; длительный профилактический эффект в течение 14 месяцев (срок наблюдения) после одного курса введения препарата.

Исследование иммунологических показателей проведены в тех же группах больных, в которых был изучен клинический эффект иммунотерапии при вакцинации Иммуновак-ВП-4. Обобщены результаты по нескольким группам больных. Применение Иммуновак-ВП4 способствовало увеличению экспрессии TLR3, TLR4 и TLR9 у больных фигурными эритемами [7]. Увеличение синтеза $IFN\gamma$ и $IFN\alpha$ выявлено при всех исследованных на этот показатель нозологиях. При этом наибольшие количества продукции $IFN\gamma$ были отмечены при пиодермиях и фигурных эритемах [7]. Изучение спектра цитокинов показало, что введение вакцин у пациентов с фигурными эритемами вызывало повышение $IFN\gamma$ при снижении IL-4. Важным показателем явилось снижение уровня IgE, что отмечено при бронхиальной астме, атопическом дерматите и фигурных эритемах [4,6,7]. Эти данные подтверждают

приведенные результаты экспериментальных исследований о действии Иммуновак-ВП-4 на активацию Т-лимфоцитов по типу Th-1, что приводит к индукции $IFN\gamma$, ингибирующего синтез IL-4 и способствующего переключению В-лимфоцитов с синтеза IgE на синтез IgG и IgA.

Введение Иммуновак-ВП-4 способствовало также формированию адаптивного иммунитета. Исследование уровня антител у больных пиодермией выявило их повышение у лиц с исходно низкими титрами к антигенам, входящим в состав Иммуновак-ВП-4, также было показано значительное увеличение аффинности антител [7].

Экспериментальные исследования показали, что Иммуновак-ВП-4 является мощным активатором эффекторов системы врожденного иммунитета, содержит большое число лигандов, связывающихся с TLRs, что способствует быстрому распознаванию патогена, в ответ на который активируются другие эффекторы врожденного иммунитета и происходит передача сигнала Т-лимфоцитам. Наиболее активно Иммуновак-ВП-4 действует на созревание дендритных клеток, что сопровождается появлением на их поверхности коstimуляторных и антигенпрезентирующих молекул. Такие созревшие DC синтезируют ряд цитокинов, из которых наибольшее значение имеет IL-12, играющий важную роль в программировании направленности активации Т-лимфоцитов по Th1-типу. Такие активированные Т-лимфоциты продуцируют $IFN\gamma$, способствующий переключению В-лимфоцитов с синтеза IgE на синтез IgG и IgA. Этот процесс имеет важнейшее значение и объясняет эффект терапии при аллергических заболеваниях, для которых характерно наличие дисбаланса в системе Th1 и Th2 лимфоцитов. Протективная активность Иммуновак-ВП-4 при защите от бактериальных и вирусных условно патогенных возбудителей также связана со значительной активацией врожденного иммунитета, поскольку эти возбудители чаще вызывают заболевания при сниженной иммунологической резистентности организма, на таком фоне чаще возникают различные осложнения. Длительный эффект, отмечаемый при терапии и профилактике этих заболеваний, также можно объяснить тем, что мощная активация врожденного иммунитета длительно сохраняется и такая ее направленность по Th1-типу способствует формированию адаптивного иммунитета.

Установленный в экспериментальных исследованиях механизм действия Иммуновак-ВП-4 и его подтверждение при клинических исследованиях определяют целесообразность использования Иммуновак-ВП-4 при воспалительных заболеваниях различной локализации, вызываемых условно патогенными микроорганизмами бактериальной и вирусной природы, аллергических заболеваниях, профилактике полиетиологического комплекса ОРЗ, различных иммунодефицитных состояниях, экстренной профилактике и терапии заболеваний, вызванных неизвестным патогеном.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахматова Н.К. Молекулярные и клеточные механизмы действия иммуномодуляторов микробного происхождения на функциональную активность эффекторов врожденного иммунитета. Автореф. дисс. докт. мед. наук. М., 2006.
2. Гусейнова З.К. Комплексный метод лечения простого рецидивирующего генитального герпеса с применением поликомпонентной вакцины ВП-4. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 2000.
3. Егорова Н.Б., Ахматова Н.К., Курбатова Е.А., Уткина Н.П., Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Клеточные и молекулярные основы антимикробного мукозального иммунитета М., ООО «ИПП КУНА», 2013.
4. Немыкина О.Е., Егорова Н.Б., Курбатова Е.А. и др. Иммунологические показатели при терапии атопического дерматита у детей поликомпонентной вакциной Иммуновак-ВП-4. Журн. микробиол. 2005, 5:45-49.
5. Немыкина О.Е., Егорова Н.Б., Щербакова Б.В. и др. Оптимизация терапии атопического дерматита с помощью иммунотерапии. Журн. микробиол. 2005, 4:53-57.
6. Осипова Г.Л. Оптимизация патогенетической терапии бронхиальной астмы и других аллергических заболеваний. Автореф. дисс. докт. мед. наук. М., 2003.
7. Сорокина Е.В., Егорова Н.Б., Масюкова С.А., Ахматова Н.К. Микробные антигены в терапии дерматозов. Медицинское информационное агенство. М., 2018.
8. Степушина М.А. Эффективность поликомпонентной бактериальной вакцины (ВП-4) при бронхиальной астме у детей. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 1996.

9. Суховская О.А., Александрова Н.И., Егорова Н.Б., Ефремова В.Н. Иммунореактивность больных хроническим бронхитом при вакцинотерапии. Журн. микробиол. 1996, 2:68-71.
10. Хаитов М.Р. Острые респираторные вирусные инфекции и бронхиальная астма. Клеточные и молекулярные аспекты проблемы. Журн.микробиол. 2002, 4:84-93.
11. Чучалин А.Г., Осипова Г.Л., Егорова Н.Б. и др. Контролируемые исследования по эффективности поликомпонентной вакцины при иммунотерапии у больных хроническими обструктивными заболеваниями органов дыхания. Пульмонология. 1995, 2:55-61.
12. Щербакова Б.В. Эффективность поликомпонентной бактериальной вакцины (ВП-4) при бронхиальной астме у детей. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 1999.
13. Medzhitov R., Janeway Jr. C.A. Innate immunity: impact in the adaptive immune response. Curr. Opin. Immunol. 1997, 9: 4-9.
14. Medzhitov R., Janeway Jr. C.A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science. 2002, 296:298-300.
15. Romagnani S., Parronchi O., Delios M.M. et al. An update on human Th1 and Th2 cells. Int. Arch. Allergy Immunol. 1997, 113:153-156.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.М.Зайцев, М.В.Брицина, М.Н.Озерецковская, Н.У.Мерцалова, И.Г.Бажанова

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК *BORDETELLA PERTUSSIS* НА АБИОТИЧЕСКОМ СУБСТРАТЕ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Выбор оптимальных условий культивирования биопленок *Bordetella pertussis* и сравнительная оценка способности разных штаммов формировать биопленки. **Материалы и методы.** Использовали вакцинный штамм *B. pertussis* № 475 и селекционированный из этого штамма штамм № 475а, отличающийся повышенной вирулентностью. В качестве инокулята для получения биопленок использовали культуры штаммов, выращенных на плотной питательной среде (ППС) и жидкой питательной среде (ЖПС). Интенсивность образования биопленок в круглодонных полистироловых 96-луночные планшетах оценивали окрашиванием 0,1% раствором генциан-фиолетового. **Результаты.** Суточные культуры штамма № 475 с ЖПС формировали умеренные биопленки в диапазоне доз 5 — 1,25 МОЕ (международных оптических единиц)/мл, при отсутствии роста на более низких дозах. Суточные культуры этого штамма с ППС формировали плотные биопленки при посевой дозе в диапазоне от 10 до 1,25 МОЕ/мл, умеренные от 0,625 до 0,157 МОЕ/мл и слабые биопленки в дозе 0,079 МОЕ/мл. Штамм № 475а с ППС формировал плотные биопленки в диапазоне доз от 10 до 0,04 МОЕ/мл и только при дозе 0,02 МОЕ/мл формировались умеренные биопленки. **Заключение.** Разработан простой и информативный метод, позволяющий оценивать способность штаммов *B. pertussis* формировать биопленки в полистироловых планшетах. Культуры, полученные с ППС, формировали более выраженные биопленки, чем культуры с ЖПС. Выявлена повышенная способность к образованию биопленок селекционированным штаммом № 475а, по сравнению с исходным штаммом № 475.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 49—53

Ключевые слова: штаммы *B. pertussis*, жидкая питательная среда, плотная питательная среда, биопленки

Е.М.Zaytsev, M.V.Britsina, M.N.Ozeretskovskaya, N.U.Mertsalova, I.G.Bazhanova

CULTIVATION OF *BORDETELLA PERTUSSIS* BIOFILMS ON ABIOTIC SUBSTRATE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Selection of optimal conditions for the cultivation of *Bordetella pertussis* biofilms and comparative assessment of the ability of different strains to form biofilms. **Materials and methods.** Used a vaccine strain of *B. pertussis* № 475 and selected from this strain strain № 475а, characterized by high virulence. Cultures of strains grown on dense nutrient medium (DNM) and liquid nutrient medium (LNM) were used as inoculates for biofilms production. The intensity of biofilms formation in round-bottom 96-well

polystyrene plates was estimated by staining with 0,1% gentian-violet solution. *Results.* Daily cultures of the strain № 475 with LNM formed moderate biofilms in the range of doses 5 — 1,25 IOU (international optical units) /ml, in the absence of growth at lower doses. The daily cultures of this strain with the DNM formed a dense biofilms when planting a doses in the range from 10 to 1,25 IOU/ml, moderate from 0,625 to 0,157 IOU/ml and weak biofilms at a dose of 0,079 IOU/ml. Strain № 475a with the DNM formed dense biofilms in the doses range of 10 to 0,04 IOU/ml and only at the dose of 0,02 IOU/ml were formed moderate biofilms. *Conclusion.* A simple and informative method has been developed to evaluate the ability of *B. pertussis* strains to form biofilms in polystyrene plates. Cultures obtained with the DNM formed a more significant biofilms than cultures with LNM. Identified high ability to biofilms formation by a selected strain №. 475a, compared to the original strain № 475.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 49—53

Key words: *B. pertussis* strains, liquid nutrient medium, dense nutrient medium, biofilms

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемический процесс коклюшной инфекции, несмотря на высокий уровень противокклюшной вакцинации, продолжается во многих странах мира. По данным ВОЗ, в 2008 г. в мире было зарегистрировано 16 млн случаев заболевания коклюшем, 195 тысяч детей погибли от него. В 2011 г. в мире зарегистрировано 162 047 случаев заболевания коклюшем, из них тяжелых 38 040 [1].

Исследования, проведенные во многих странах мира, показали, что основными причинами роста заболеваемости коклюшем является несоответствие генотипов *B. pertussis* циркулирующих штаммов генотипам вакцинных штаммов *B. pertussis*, вследствие адаптации бактерий к вакцинированной популяции, что привело к снижению иммунитета и возникновению вспышек заболевания коклюшем. Мутации в генах, кодирующих основные факторы вирулентности, аллельный полиморфизм и редукция генома *B. pertussis* привели к появлению циркулирующих штаммов *B. pertussis*, несущих в генотипе *ptxP3* аллель оперона коклюшного токсина, отличающийся повышенной вирулентностью и ассоциирующийся с увеличением заболеваемости коклюшем [9,11]. При этом, одним из возможных факторов высокой вирулентности циркулирующих штаммов может быть их повышенная способность к формированию биопленок. Обсуждается также возможность продукции биопленочными формами *B. pertussis* новых антигенов, не входящих в состав современных вакцин [6 — 8].

В настоящее время доказана роль микробных биопленок в развитии целого ряда инфекций человека. Установлено, что различные виды бактерий формируют биопленки на любых биотических и абиотических субстратах. Биопленочные формы бактерий отличаются от планктонных измененным спектром экспрессии генов и обладают повышенной устойчивостью к факторам внешней среды (антибиотикам, дезинфектантам, иммунным факторам) [3]. Способность коклюшного микроба формировать биопленки в биотических и абиотических условиях, механизмы формирования биопленок, их структура и функция изучены до настоящего времени недостаточно. Изучение закономерностей формирования биопленок *B. pertussis*, анализ способности штаммов коклюшного микроба с различными генотипическими характеристиками к формированию биопленок может внести существенный вклад в изучение патогенеза коклюша и совершенствование средств профилактики этой инфекции.

Цель работы заключалась в выборе оптимальных условий культивирования для образования биопленок *B. pertussis* и сравнительная оценка способности разных штаммов формировать биопленки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биопленочные формы *B. pertussis* культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах в соответствии с ранее описанным методом [10] в нашей модификации. В опытах использовали вакцинный штамм № 475 (серовар 1.2.3) и селекционированный из этого штамма штамм № 475a [5]. В качестве инокулята для получения биопленок использовали ночную культуру штаммов, выращенных на плотной пита-

тельной среде («Бордетелагар», ГНЦПМБ, г.Оболенск) и жидкой (шуттелируемой) синтетической питательной среде [4]. Концентрацию микробных клеток (МОЕ/мл) определяли с помощью отраслевого стандартного образца мутности (ОСО42-28-85-08 П, 10 МЕ, Научный центр экспертизы средств медицинского применения).

Культуры, выращенные на жидкой и плотной питательных средах, доводили до концентрации микроорганизмов 20 МОЕ/мл. Затем коклюшные культуры титровали в пробирках с жидкой синтетической питательной средой начиная с 10 МОЕ/мл до 0,01 МОЕ/мл с двукратным интервалом. Каждое разведение культур в объеме 200 мкл вносили в 4 — 8 лунок круглодонных 96-луночных планшетов (Nunc, Дания). Дополнительно в 4 — 8 лунок вносили жидкую синтетическую питательную среду в качестве негативного контроля. Планшеты накрывали крышкой и выдерживали в термостате при 37°С в течение 24 и 48 ч. После окончания культивирования бактерий из лунок планшета осторожно удаляли питательную среду с планктонными клетками. Затем лунки с биопленками промывали 2-3 раза стерильным фосфатно-солевым буферным раствором рН 7,2. После этого в каждую лунку добавляли по 200 мкл 0,1% раствора генциан-фиолетового. Планшеты выдерживали с красителем в течение 10-15 минут при комнатной температуре, после чего удаляли из лунок несвязавшийся краситель, тщательно промывая планшеты водопроводной водой. Планшеты переворачивали на фильтровальную бумагу вверх дном и высушивали при комнатной температуре. Затем в лунки добавляли 95% этиловый спирт в объеме 200 мкл. Через 2-3 мин содержимое лунок переносили в чистые 96-луночные плоскодонные планшеты («Linbro») и измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 620 нм с помощью вертикального спектрофотометра «Multiskan FC», Finland. Интенсивность образования биопленок оценивали по показателям ОП окрашенного растворителя по отношению к негативному контролю как плотные ($t > 4$), умеренные ($t \leq 4$), слабые ($t \leq 2$), отсутствие биопленок [2]. Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Excel (Microsoft, США) с применением параметрических методов сравнения при нормальном распределении (t-критерий Стьюдента).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований были разработаны оптимальные условия образования биопленок микробными клетками *V. pertussis*: интенсивность образования биопленок при различных концентрациях клеток при засеве на 96-луночные полистироловые планшеты, длительность культивирования. Также было проведено сравнительное изучение способности формирования биопленок культурами *V. pertussis*, выращенными в жидкой и плотной питательных средах. Полученные результаты приведены в табл. 1. Результаты опытов выявили существенные различия между ин-

Таблица 1. Формировании биопленок культурами штамма № 475, выращенными на жидкой и плотной питательных средах

Доза культуры (МОЕ/мл)	Питательная среда			
	Жидкая		Плотная	
	Срок культивирования			
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
	Тип биопленки/Оптическая плотность (t*)			
5	Умеренная/4	Плотная/4,6	Плотная/24,3	Плотная/6,5
2,5	Умеренная/2,6	Плотная/4,7	Плотная/9,3	Плотная/6,5
1,25	Умеренная/2,3	Плотная/4,5	Плотная/12,9	Плотная/10,7
0,625	Слабая/1,5	Умеренная/2,5	Плотная/6,15	Плотная/16,1
0,313	Нет/0,02	Умеренная/3,2	Умеренная/3,3	Плотная/7,5
0,157	Нет/0,02	Умеренная/2,6	Умеренная/3,0	Плотная/10,3
0,079	Нет/0,02	Слабая/1,4	Умеренная/2,8	Плотная/9,2

Примечание. * Отношение оптической плотности опытного образца к оптической плотности негативного контроля (здесь и в табл. 2).

тенсивностью образования биопленок культурами штамма № 475, выращенными в жидкой и плотной питательных средах.

При этом культуры, полученные с плотной питательной среды, формировали более выраженные биопленки, чем культуры с жидкой питательной среды. Суточные культуры с жидкой питательной среды формировали умеренные биопленки в диапазоне доз 5 — 1,25 МОЕ/мл при отсутствии роста на более низких дозах. Увеличение срока культивирования до 48 ч сопровождалось некоторым увеличением интенсивности образования биопленок. Плотные биопленки формировались при дозах 5-1,25 МОЕ/мл, а умеренные в дозах 0,625 — 0,157. Суточные культуры с плотной питательной среды формировали плотные биопленки при посевных дозах от 5 до 0,625 МОЕ/мл, а умеренные в дозах 0,313-0,079 МОЕ/мл. При увеличении срока культивирования до 48 ч были получены плотные биопленки при всех испытанных посевных дозах (5-0,04 МОЕ/мл). Таким образом, оптимальный срок культивирования, позволяющий оценить интенсивность образования биопленки *B. pertussis*, составил 24 ч.

После отработки условий культивирования мы провели сравнительное изучение способности образования биопленок двумя штаммами *B. pertussis*: вакцинным штаммом № 475 и селекционированным из него штаммом № 475а. Полученные с плотной питательной среде культуры штаммов выращивали в полистироловых планшетах фирмы Nunc в течение суток. Приведенные в табл. 2 данные указывают на значительные различия между исследованными штаммами по интенсивности образования биопленок. Исходный штамм № 475 формировал плотные биопленки при посевной дозе в диапазоне от 10 до 1,25 МОЕ/мл, умеренные от 0,625 до 0,157 МОЕ/мл и слабые биопленки в дозе 0,079 МОЕ/мл. При более низкой посевной дозе формирования биопленок не происходило. Селекционированный штамм отличался от исходного повышенной способностью образования биопленки. Плотные биопленки формировались при посевной дозе в диапазоне от 10 до 0,4 МОЕ/мл и только при дозе 0,02 МОЕ/мл формировались умеренные биопленки.

Таким образом, нами был разработан достаточно простой и воспроизводимый метод, позволяющий оценивать способность штаммов *B. pertussis* формировать биопленочные культуры на абиотическом субстрате. Установлено оптимальное время культивирования, проведено сравнительное изучение интенсивности образования биопленок культурами, выращенными на жидкой и плотной питательных средах. Более интенсивной рост биопленок культур, полученных с плотной питательной среды, по сравнению с планктонными культурами, может быть обусловлен особенностью экспрессии поверхностных структур, ответственных за адгезию микробных клеток на субстрате. Важное значение имеют выявленные нами выраженные отличия между штаммами № 475 и № 475а по способности к формированию биопленок. Штамм № 475а был селекционирован из исходного штамма № 475 и отличался от него повышенной вирулентностью и повышенным уровнем продукции коклюшно-

Таблица 2. Образование биопленок *B.pertussis* штаммами № 475 и 475а с плотной питательной среды

Разведение культуры в МОЕ/мл	Штамм <i>B.pertussis</i> № 475			Штамм <i>B.pertussis</i> № 475а		
	Оптическая плотность		Продукция биопленки	Оптическая плотность		Продукция биопленки
	t*	растворителя M±2m		t*	растворителя M±2m	
10	6,6	0,106±0,006	Плотная	18,7	0,211±0,006	Плотная
5	4,8	0,104±0,008	Плотная	20,1	0,224±0,006	Плотная
2,5	9,6	0,104±0,004	Плотная	17,9	0,204±0,006	Плотная
1,25	4,9	0,085±0,006	Плотная	18,9	0,194±0,004	Плотная
0,625	4,0	0,056±0,001	Умеренная	13,7	0,166±0,006	Плотная
0,313	3,3	0,052±0,001	Умеренная	10,4	0,147±0,006	Плотная
0,157	2,1	0,050±0,001	Умеренная	11,8	0,126±0,005	Плотная
0,079	1,5	0,049±0,001	Слабая	11,2	0,111±0,004	Плотная
0,040	0,125	0,047±0,004	Нет	8,2	0,092±0,004	Плотная
0,020	0,02	0,046±0,001	Нет	2,0	0,057±0,004	Умеренная
Негативный контроль		0,046±0,0006			0,044±0,0006	

го токсина [5]. Таким образом, прослеживается определенная связь между интенсивностью формирования биопленок и вирулентностью исследованных штаммов. Повышенная способность к образованию биопленок селекционированным штаммом может быть связана с изменением экспрессии факторов, обеспечивающих прикрепление микробных клеток к субстрату и межклеточные взаимодействия. Полученные результаты открывают новые возможности в исследовании механизмов формирования биопленок *B. pertussis*, вирулентности штаммов с различными генотипическими характеристиками и факторов, влияющих на эти процессы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Еженедельный эпидемиологический бюллетень. Вакцины против коклюша: документ по позиции ВОЗ, август 2015 г., № 35:433-460. <http://www.who.int/wer>.
2. Марданова А.М., Кабанов Д.А, Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие. Казань: К(П)ФУ, 2016.
3. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 3: 99-109.
4. Способ глубинного культивирования коклюшных бактерий. Авторское свидетельство № 762431 от 16.05.1980 г.
5. Штамм бактерий *Bordetella pertussis* — продуцент коклюшного токсина. Авторское свидетельство №1761795 от 15.05.1992 г.
6. Cattelan N., Dubey P., Arnal L. et al. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016 Feb;74(1):ftv108. doi: 10.1093/femspd/ftv108. Epub 2015 Nov 19.
7. Cattelan N., Jennings-Gee J., Dubey P. et al. Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infect. Immun.* 2017 Nov 17;85(12). pii: e00373-17. doi: 10.1128/IAI.00373-17. Print 2017 Dec.
8. Dorji D., Mooi F., Yantorno O. et al. *Bordetella Pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Med. Microbiol. Immunol.* 2018 Feb; 207(1):3-26. doi: 10.1007/s00430-017-0524-z. Epub 2017 Nov 21.
9. King A.J., van Gorkom T., van der Heide H.G. et al. Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? *BMC Genomics.* 2010 Jan 26;11:64.
10. O'Toole G.A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47: 2437.
11. Wagner B., Melzer H., Freymüller G. et al. Genetic Variation of *Bordetella pertussis* in Austria. *PLoS One.* 2015 Jul 16;10(7):e0132623.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Н.В.Крылова¹, С.А.Федореев², В.Ф.Лавров¹, Н.П.Мищенко², Е.А.Васильева², О.А.Свитич³, Л.К.Эбралидзе³, О.В.Иунихина¹, Г.Н.Леонова¹

ПРОТИВОВИРУСНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭХИНОХРОМА А И КОМПОЗИЦИИ АНТИОКСИДАНТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, ²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.Елякова, Владивосток; ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Изучение антиоксидантной и противовирусной активности эхинохрома А и композиции антиоксидантов на его основе в отношении вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ) и простого герпеса 1 типа (ВПГ-1). **Материалы и методы.** ВКЭ (штамм Dal'negorsk, дальневосточного субтипа) выращивали на культуре клеток СПЭВ, ВПГ-1 (штамм VR3) — на культуре клеток Vero. Антиоксидантную активность соединений определяли с использованием модели перекисного окисления липидов. Цитотоксическую и противовирусную активность соединений оценивали по жизнеспособности клеток СПЭВ и Vero и подавлению цитопатогенного действия ВКЭ и ВПГ-1. **Результаты.** Композиция антиоксидантов (смесь эхинохрома А, аскорбиновой кислоты и α -токоферола — 5:5:1) обладала более выраженным антиоксидантным и противовирусным действием, чем эхинохром А. Механизмы противовирусной активности эхинохрома А и композиции антиоксидантов, вероятно, обусловлены его способностью непосредственно инактивировать вирусы и подавлять процесс заражения вирусами культур клеток. **Заключение.** Полученные результаты

свидетельствуют о перспективности использования эхинохрома А и композиции антиоксидантов в качестве противовирусных препаратов.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 53—58

Ключевые слова: эхинохром А, композиция антиоксидантов, противовирусная активность

*N.V.Krylova¹, S.A.Fedoreev², V.F.Lavrov³, N.P.Mischenko², E.A.Vasileva², O.A.Svitich³,
L.K.Ebralidze³, O.V.Eunihina¹, G.N.Leonova¹*

ANTIVIRAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE COMPOSITION OF COMPOUNDS BASED ON ECHINOCHROME A

¹Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok; ³Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

The aim of this study was to examine in vitro the antioxidant and antiviral activity of echinochrome A and echinochrome-based antioxidant composition against tick-borne encephalitis virus (TBEV) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Materials and methods. TBEV (Dal'negorsk strain, Far Eastern subtype) grown in PK cells, and HSV-1 (VR3 strain) in Vero cells. The antioxidant activity of the compounds was determined using the linetol peroxide oxidation model. The cytotoxicity and antiviral activity of the compounds were assessed by cell viability (PK- and Vero cells) and by cytopathic effect inhibition of viruses (TBEV and HSV-1) using the MTT test. Results. The antioxidant composition, which is a mixture of echinochrome A, ascorbic acid and α -tocopherol (5: 5: 1), showed a higher antioxidant and antiviral efficacy than echinochrome A. The antiviral mechanisms on of echinochrome A and antioxidant composition are caused by direct inactivation of TBEV and HSV-1 viruses and inhibition of virus penetration into cells. Conclusion. The results obtained allow considering the echinochrome A and the composition of antioxidants on its basis as the promising agents of a broad-spectrum antiviral activity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 53—58

Key words: echinochrome A, composition of antioxidants, antiviral activity

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс, индуцированный нейротропными вирусами, играет важную роль в патогенезе вирусных инфекций. Ткани ЦНС отличаются высоким содержанием липидов, в связи с чем, они особенно чувствительны к перекисному окислению [17]. Активация процессов свободно-радикального окисления и резкое угнетение антиоксидантной и антирадикальной систем защиты организма наблюдается у больных клещевым энцефалитом [4] и при манифестации герпетической инфекции [15, 16]. Известно, что антиоксиданты препятствуют разрушительному влиянию активных форм кислорода, в том числе, негативному воздействию свободных радикалов, следовательно, предотвращают развитие заболеваний, связанных с окислительным стрессом и, вероятно, могут оказывать терапевтический эффект [5, 11]. Поскольку наиболее важным аспектом в лечении вирусных инфекций является подавление репликации вируса, то поиск среди природных антиоксидантов химических соединений, обладающих противовирусными свойствами, весьма актуален, а применение препаратов с противовирусной и антиоксидантной активностью является приоритетной задачей в борьбе с вирусной патологией. Одним из перспективных природных антиоксидантов, который, вероятно, может обладать и противовирусными свойствами, является эхинохром А (хиноидный пигмент морских ежей), хорошо зарекомендовавший себя в комплексной терапии сетчатки и роговицы глаз, а также в кардиологической практике [2, 3].

Целью настоящего исследования было изучение антиоксидантной и противовирусной активности эхинохрома А, а также композиции антиоксидантов на модели вирусной инфекции, вызываемой вирусами клещевого энцефалита и простого герпеса 1 типа in vitro.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были использованы два вируса: клешевого энцефалита (ВКЭ) и простого герпеса 1 типа (ВПГ-1). ВКЭ (штамм Dal'negorsk, дальневосточного субтипа) выделен в 1973 году из мозга умершего больного с очаговой формой заболевания (номер полнотекстовой последовательности в GenBank — FJ402886) [13]. Титр ВКЭ составил $10^{8,8}$ TCID₅₀/мл. Противовирусную активность препаратов в отношении ВКЭ исследовали на перевиваемой культуре клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ), выращенных в среде 199 с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров и 100 ЕД/мл гентамицина при 37°C в атмосфере 5% CO₂. ВПГ-1 (штамм VR3) получен из Национальной коллекции вирусов США (Rockville, Maryland, USA). Титр ВПГ-1 составил $10^{8,25}$ TCID₅₀/мл. Противовирусную активность препаратов в отношении ВПГ-1 изучали, используя перевиваемую культуру клеток Vero, выращенных в полной культуральной среде DMEM с добавлением 5-10% сыворотки эмбрионов коров, 0,008% раствора гентамицина сульфата и глутамина при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Концентрация клеток во всех экспериментах составляла 10⁴ кл/мл.

Исследовали эхинохром А (2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон), композицию антиоксидантов — эхинохром А (Эх), аскорбиновая кислота и α-токоферол в массовом соотношении 5:5:1, установленным в процессе проведения исследований. Плацебо — композиция, содержащая аскорбиновую кислоту и α-токоферол в массовом соотношении 5:1. Тестируемые препараты растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO, Sigma, USA) и хранили при -20°C. Рабочие растворы готовили из стоковых растворов (10 мг/мл), разводя соответствующей культуральной средой. Конечная концентрация DMSO в рабочих растворах составляла 0,5%.

Антиоксидантная активность определялась на модели перекисного окисления линетол, содержащего сложную смесь этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот (олеиновой, линолевой и линоленовой) льняного масла при 37°C [1]. Стоковые растворы эхинохрома, аскорбиновой кислоты и α-токоферола готовили в концентрации 10 мг/мл этилового спирта. Бинарные и тройные композиции антиоксидантов получали, смешивая объемы стоковых растворов в указанных соотношениях, добавляли линетол и помещали в термостат при 37°C. Концентрация антиоксидантов в линетоле составляла 0,05 мг/мл или 0,005%, 2 раза в сутки массу предварительно охлажденных до 18-20°C реакционных смесей измеряли. По мере увеличения массы на 10 мг реакцию останавливали. Период ингибирования окисления линетол (Δτ) определяли с учетом разности времени, за которое масса линетол увеличивалась на 10 мг по формуле: $\Delta\tau = \tau - \tau_0$, где τ — время начала окисления линетол в присутствии антиоксиданта (ч); τ₀ — время начала окисления линетол без антиоксиданта (ч).

Цитотоксическую активность оценивали с учетом жизнеспособности клеток в МТТ-тесте [12]. На 24-часовой монослой клеток, выращенных в 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах (СПЭВ для ВКЭ и Vero для ВПГ-1, 2х10⁴ кл./лунку), наносили тестируемые вещества и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 6 суток. Затем в культуру на 60 минут добавляли 5 мг/мл МТТ (метилтиазазолилтетразолия бромид, Sigma, USA) и после этого изопропиловый спирт. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре при длине волны 540 нм. Жизнеспособность клеток рассчитывали по формуле: (ОП_о)/(ОП_к)×100%, где ОП_о — оптическая плотность клеточной суспензии, обработанной тестируемыми препаратами, ОП_к — оптическая плотность необработанной клеточной суспензии; 50% цитотоксическую концентрацию препаратов (CC₅₀) устанавливали с учетом концентрации вещества, снижающего количество жизнеспособных клеток на 50% по сравнению с контролем, используя метод регрессионного анализа.

Противовирусная активность оценивалась визуально по степени подавления цитопатогенного действия (ЦПД) вирусов в культуре клеток с помощью инвертированного микроскопа (Биолам П-1, ЛОМО, РФ), а также в МТТ-тесте [10,14]. Концентрации препаратов составляли от 0 до 400 мкг/мл, инфицирующая доза ВКЭ и ВПГ-1 — 10² TCID₅₀/мл. Вирусы и препараты наносили на монослой клеток СПЭВ

или Vero одновременно и инкубировали в течение 6 суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Оценка противовирусной активности осуществлялась с учетом степени подавления (IR) цитопатогенного действия вирусов тем или иным препаратом, в частности, по 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀) и селективному индексу (SI). IR рассчитывали по формуле: $IR = (\text{ОП опыт} - \text{ОП вир. контроль}) / (\text{ОП кл. контроль} - \text{ОП вир. контроль}) \times 100\%$. IC₅₀ устанавливали с помощью регрессионного анализа, SI рассчитывали, как отношение CC₅₀ к IC₅₀. Во всех схемах тестирования противовирусного действия исследуемых соединений их концентрация составляла 20 мкг/мл. При этом инфицирующая доза ВКЭ и ВПГ-1 была равна 10² TCID₅₀/мл. Противовирусную активность соединений определяли с учетом степени подавления (IR) ими цитопатогенного действия вирусов в МТТ-тесте.

Схемы определения противовирусной активности препаратов: (1) определение вирулицидной активности — вирусосодержащую жидкость смешивали с препаратом в соотношении 1:1, инкубировали в течение 60 минут при 37°C. Затем смесь наносили на монослой клеток и инкубировали в течение 6 суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂. (2) определение профилактической активности: монослой клеток обрабатывали одним из исследуемых препаратов в течение 60 минут при 37°C. Затем клетки инфицировали одним из вирусов (ВКЭ или ВПГ-1) и инкубировали в течение 6 суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂. (3) определение вирусингибирующей активности: монослой клеток инфицировали вирусом в течение 60 минут при t 37° С. Затем к клеткам добавляли исследуемый препарат и в течение 6 суток инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Представленные схемы определения противовирусной активности были детально отработаны в ранее описанных экспериментах [6 — 8].

Статистическую обработку данных проводили, используя пакет программ Statistica 10.0. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Сравнение различий между показателями контрольной и опытной групп осуществляли с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок. Различия считались достоверными при p≤0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение антиоксидантной активности препаратов на модели перекисного окисления линетола позволило провести сравнительный анализ антиоксидантных свойств эхинохрома А, α-токоферола и аскорбиновой кислоты, а также найти оптимальное соотношение в композиции этих компонентов при реализации антиоксидантных и прооксидантных свойств. Установлено, что из всех антиоксидантов наиболее активным оказался α-токоферол (Δt 125 ч), эхинохром А был менее активен (Δt 100 ч), а аскорбиновая кислота в этих условиях (без α-токоферола) не обладает антиоксидантной активностью, что подтвердилось результатами опытов (Δt для смеси Аск+Ток в соотношении 2:1 составляло 195 ч). Наиболее выраженный антиокислительный эффект в отношении линетола продемонстрировала смесь (Эх+Аск+Ток) в соотношении 5:5:1. При этом был показан выраженный синергизм действия компонентов композиции (Δt 223 ч) и их высокая стабильность в течение 12 месяцев.

С помощью МТТ-анализа были рассчитаны 50% цитотоксические концентрации (CC₅₀) исследуемых соединений в культурах клеток СПЭВ и Vero и селективные индексы (SI), характеризующие их противовирусную активность (табл.). При этом установлено, что плацебо обладает незначительной цитотоксической активностью, по сравнению с эхинохромом А и композицией антиоксидантов (p<0,05). Одновременная обработка клеток СПЭВ исследуемыми соединениями в концентрациях от 0 до 400 мкг/мл и ВКЭ (10²TCID₅₀/мл) демонстрировала умеренную противовирусную активность эхинохрома А и композиции антиоксидантов. Вместе с тем, композиция обладает способностью подавлять ЦПД ВКЭ при существенно более низких IC₅₀-концентрациях и более высоких показателях SI, чем один эхинохром А (p<0,05). Заражение клеток Vero ВПГ-1 с одновременной обработкой тестируемыми препаратами показало, что селективный индекс композиции (эффективность действия) был достоверно выше соответствующего показателя для эхинохрома А и плацебо (p<0,05) (табл.).

Противовирусная активность препаратов в отношении вирусов клещевого энцефалита и простого герпеса 1 типа

Препарат	ВКЭ			ВПГ-1		
	CC ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл)	SI	CC ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл)	SI
Композиция антиоксидантов	57,9±2,3*	12,6±1,5**	4,8±0,5**	66,7±3,2*	11,2±1,2**	6,0±0,6**
Эхинохром А	54,4±1,8*	21,8±2,6*	2,5±0,2*	60,5±3,1*	18,8±2,1*	3,2±0,3*
Плацебо	521,7±5,3	1304±145	0,4±0,1	530,9±9,4	885±97	0,6±0,1

Примечание. * Статистически значимые различия между показателями плацебо и остальными препаратами ($p \leq 0,05$), ** между показателями композиции антиоксидантов и эхинохромом А ($p \leq 0,05$).

Особенности влияния препаратов на разные стадии жизненного цикла ВКЭ и ВПГ-1, в том числе: а) стадию адсорбции вируса на клетках (профилактическое действие); б) стадию репликации вируса (вирусингибирующее действие); в) непосредственное влияние на вирус (вирулицидное действие) были определены с помощью МТТ-анализа. Установлено, что наиболее выраженный вирулицидный эффект наблюдался после непосредственной обработки вируса соответствующим соединением перед заражением культуры клеток. При этом степень подавления (IR) эхинохромом А и композицией антиоксидантов цитопатогенного действия ВКЭ составляла, соответственно, $75 \pm 4\%$ и $89 \pm 5\%$, а IR ВПГ-1 $\sim 100\%$ (IR плацебо $\sim 30\%$). Обработка клеток СПЭВ и Vero исследуемыми препаратами перед их заражением вирусами (профилактическое действие) оказалась мало эффективной. После обработки клеток композицией антиоксидантов ($35 \pm 3\%$) и плацебо ($24 \pm 3\%$) вирусингибирующая активность препаратов имела значимые различия ($p < 0,05$) лишь в опытах с ВПГ-1. Вирусингибирующую активность на ранней стадии репликации вируса (через 60 минут после заражения) показали как эхинохром А, так и композиция антиоксидантов. Она составила $21 \pm 2\%$ и $36 \pm 3\%$ при ВКЭ-инфекции и, соответственно, $28 \pm 3\%$ и $43 \pm 4\%$ при герпетической инфекции (у плацебо $\sim 10\%$, $p < 0,05$). Следует отметить, что степень подавления репликации вирусов композицией антиоксидантов была, как правило, выше таковой, опосредованной лишь одним эхинохромом А ($p < 0,05$).

Ранее была выявлена способность эхинохрома А преодолевать гематоэнцефалический барьер [6], что стало предпосылкой для изучения противовирусных свойств данного соединения. Обозначились перспективы усиления антиоксидантного и противовирусного действия эхинохрома А в сочетании с другими природными антиоксидантами. Выяснилось, что композиция антиоксидантов (эхинохром А, аскорбиновая кислота и α -токоферол) демонстрирует более высокую ($p < 0,05$) антиоксидантную активность, чем каждый из компонентов в отдельности. Так, IC₅₀ композиции были в 1,5 раза ниже, а SI, соответственно, выше, чем у одного эхинохрома А. Анализ влияния эхинохрома А и композиции антиоксидантов на жизненные циклы ВКЭ и ВПГ-1 показал, что основным механизмом противовирусного (вирулицидного) действия этих соединений является непосредственная инактивация вирусных частиц. Нельзя также исключить, что высокая вирулицидная активность исследуемых соединений обусловлена их способностью препятствовать взаимодействию прикрепительных вирусных белков и «вируспецифических» рецепторами клеток. Не исключено, что эти соединения могут подавлять ранние этапы репликации вируса, а также, что их активность связана с модуляцией внутриклеточных сигнальных путей. В научной литературе указано на способность природных антиоксидантов проявлять противовирусную активность. Так, Yu.Zhang et al. продемонстрировали результаты исследований по влиянию антиоксидантов на вирус японского энцефалита [19]. Действие антиоксидантов через клеточные сигнальные пути при гриппозной инфекции представлены в исследовании Yinghua Li et al. [18]. Тем не менее, несмотря на очевидную перспективность, подобных работ относительно мало, в связи с чем, полученные нами материалы свидетельствуют о целесообразности дальнейшего углубленного исследования этих соединений в качестве противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект RFMEF161317X0076).

ЛИТЕРАТУРА

1. Веселова М.В., Федореев С.А., Василевская Н.А., Денисенко В.А., Герасименко А.В. Антиоксидантная активность полифенолов из дальневосточного растения тиса остроколючного. Хим. фарм. журн. 2007, 41(2):29-34.
2. Еляков Г.Б., Максимов О.Б., Мищенко Н.П., Кольцова Е.А., Федореев С.А., Глебо Л.И., Красовская Н.П., Артюков А.А. Патент: 2134107 С1, Российская Федерация. Препарат гистохром для лечения воспалительных заболеваний сетчатки и роговицы глаз. Оpubл. 10.08.1999, Бюл. № 22.
3. Еляков Г.Б., Максимов О.Б., Мищенко Н.П., Кольцова Е.А., Федореев С.А., Глебо Л.И., Красовская Н.П., Артюков А.А. Патент: 2137472 С1, Российская Федерация. Лекарственный препарат гистохром для лечения острого инфаркта миокарда и ишемической болезни сердца. Оpubл. 23.04.1999, Бюл. № 26.
4. Захарычева Т.А., Ковальский Ю.Г., Лебедев О.А., Мжельская Т.В. Оксидативный стресс у больных клещевым энцефалитом на Дальнем Востоке Российской Федерации. Дальневост. журн. инфекц. патол. 2012, 20:41-45.
5. Крылова Н.В., Попов А.М., Леонова Г.Н. Антиоксиданты как потенциальные противовирусные препараты при флавивирусных инфекциях. Антибиотики и химиотер. 2016, 61:5-6.
6. Свитич О.А., Ковальчук Л.В., Банковская Л.В., Лавров В.Ф., Гервасиева В.Б., Парфенова Т.М., Конищева А.Ю., Головин Г.Г., Лабжинов П.А. Аналитический подход в изучении противовирусного и иммуномодулирующего действия препаратов на модели герпесвирусной инфекции IN VITRO. Российский иммунологический журнал. 2013, 7(16), 4:377-384.
7. Сомова О.Ю., Ганковская О.А., Лавров В.Ф., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Динамика экспрессии молекул TLR9-опосредованного сигнального пути эпителиальными клетками цервикального канала под действием вируса простого герпеса 2 типа IN VITRO. Российский иммунологический журнал. 2011, 5(14), 2:129-134.
8. Сопова Е.А., Баранов В.И., Ганковская О.А., Лавров В.Ф., Зверев В.В. Влияние нанопорошков серебра и диоксида кремния на развитие герпесвирусной инфекции IN VITRO. Гигиена и санитария. 2010, 4:89-91.
9. Стоник В.А., Гусев Е.И., Мартынов М.Ю., Гусева М.Р., Шукин И.А., Агафонова И.Г., Мищенко Н.П., Федореев С.А. Поиск веществ для лечения геморрагического инсульта. Использование магнитно-резонансной томографии в оценке эффективности гистохрома. Доклады Академии наук. 2005, 405(5):1-3.
10. Bastos J.C.S., de Menezes C.B.A., Fantinatti-Garboggini F. et al. Antiviral Activity of Marine Actinobacteria against Bovine Viral Diarrhea Virus, a Surrogate Model of the Hepatitis C Virus. RRJMB. 2015, 4(4):55-62.
11. Firuzi O., Miri R., Tavakkoli M. et al. Antioxidant therapy: current status and future prospects. Curr. Med. Chem. 2011, 18:3871-3888.
12. Kavouras J.H., Prandovszky E., Vályi-Nagy K. et al. Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures. J. Neurovirol. 2007, 13(5):416-425.
13. Leonova G.N., Maystrovskaya O.S., Kondratov I.G. et al. The nature of replication of tick-borne encephalitis virus strains isolated from residents of the Russian Far East with inapparent and clinical forms of infection. Virus Res. 2014, 189:34-42.
14. Matsuda M., Shigeta S., Okutani K. Antiviral activities of marine Pseudomonas polysaccharides and their oversulfated derivatives. Mar. Biotechnol. 1999, 1:68-73.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 1983, 65:55-63.
16. Sebastiano M., Chastel O., deThoisy B. et al. Oxidative stress favours herpes virus infection in vertebrates: a meta-analysis. Current Zoology. 2016, 62(4):325-332.
17. Vályi-Nagy T., Dermody T.S. Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. Histol. Histopathol. 2005, 20:957-967.
18. Yinghua Li, Zhengfang Lin, Min Guo et al. Inhibition of H1N1 influenza virus-induced apoptosis by functionalized selenium nanoparticles with amantadine through ROS-mediated AKT signaling pathways. Int. J. Nanomedicine. 2018, 13:2005-2016.
19. Zhang Y., Wang Z., Chen H. et al. Antioxidants: potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection. International Journal of Infectious Diseases. 2014, 24:30-36.

ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЯ МЕДИАТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И АУТОРЕАКТИВНОСТИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ, СОЧЕТАННОЙ С ОЖИРЕНИЕМ

НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова, Москва

Цель. Исследовать иммунологические маркеры воспаления и показатели аутоиммунитета, отражающие патогенетические особенности бронхиальной астмы (БА) на фоне ожирения. **Материалы и методы.** Были обследованы 109 человек в возрасте от 17 до 58 лет с различной массой тела, 64 из которых имели аллергические заболевания. Проводили клинко-антропометрическое исследование с измерением индекса массы тела в соответствии с критериями ВОЗ, а также оценивали тяжесть течения основного заболевания и данные анамнеза. В образцах периферической крови определяли биохимические показатели (холестерин и его фракции), спонтанную и ФГА-индуцированную продукцию цитокинов IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α клетками цельной крови, а также сывороточное содержание С-реактивного белка (СРБ), лептина, общего IgE и IgE-аутоАТ, специфичных к ряду тканевых АГ (эпителиальному кератину, коллагену 3 и 6 типов, эластину и миозину). **Результаты.** Проведенное нами исследование показало, что лица, имеющие избыточную массу тела, характеризуются повышенным уровнем острофазовых показателей (СОЭ, СРБ) и провоспалительных цитокинов (TNF- α) в сыворотке крови, подтверждая этим участие системного воспаления в патогенезе ожирения. Клинический фенотип БА в сочетании с ожирением характеризуется избыточным содержанием СРБ, лептина на фоне повышенной спонтанной продукции IL-4 и TNF- α , свидетельствующих об активации провоспалительного каскада, а также сопровождается повышенным уровнем продукции аутоАТ sIgE к кератину, что в совокупности отражает более выраженный характер провоспалительных реакций и снижения регуляторной функции иммунной системы в данной когорте пациентов. **Заключение.** Полученные нами данные свидетельствуют о наличии патогенетической взаимосвязи между аллергическим воспалением, гиперреактивностью и хроническим воспалением, обусловленным ожирением, и влиянием последнего на иммуноопосредованные патологические процессы органов дыхания.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 59—63

Ключевые слова: бронхиальная астма, ожирение, воспаление, цитокины

4 Yu.Konischeva, V.B.Gervazieva, S.A.Mazurina

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL INFLAMMATORY PATTERNS OF BRONCHIAL ASTHMA IN OBESE PATIENTS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

We aimed to investigate immunological patterns of inflammation and autoimmunity, in bronchial asthma (BA) associated with obesity. **Materials and methods.** 109 people aged from 17 to 58 years with various body weights have been examined in total, including 64 individuals with allergic diseases as bronchial asthma (BA) and allergic rhinitis (AR). We performed the measurement of the body mass index according to WHO criteria, and evaluation of the asthma severity and comorbid conditions. In the samples of peripheral blood we measured biochemical tests (cholesterol and its fractions), spontaneous and PHA-induced production of cytokines: IL-4, IL-10, IL-17, TNF-, and serum levels of C-reactive protein (CRP), leptin, total IgE and IgE-autoAT, specific for a number of tissue AH (epithelial keratin, collagen 3 and 6 types, elastin and myosin). **Results.** Our study showed that in both groups of adults, the obesity was associated with increasing of acute phase proteins, CRP, leptin and TNF- α in serum, being most enhanced in asthma group. Individuals with excess body weight are characterized by significantly an increased level of acute phase proteins (Westergren ESR, CRP) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α) in serum, thereby confirming the involvement of systemic inflammation in the obesity pathogenesis. The phenotype of BA with obesity is characterized by overproduction of CRP and leptin, along with increased spontaneous production of IL-4 and TNF- α , and also revealed sIgE to self-antigen as keratin, that in total could indicate more prominent inflammatory pathways with the impairment of immune regulation in this endotype of patients. **Conclusion.** The revealed associations confirm the link between obesity, as a chronic inflammatory condition, with atopy and development of asthma with further immune-mediated inflammation of the conduction airways.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 59—63

Key words: asthma, obesity, inflammation, cytokines

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире отмечается прогрессирующий рост распространенности ожирения и связанных с ним метаболических нарушений, которые осложняют течение хронических заболеваний, в том числе имеющих иммуноопосредованный патогенез. Экспертами ВОЗ ожирение характеризуется как неинфекционная пандемия XXI века: по данным на 2014 год более 1,9 миллиарда (39%) взрослых лиц старше 18 лет имели избыточный вес и свыше 600 миллионов (13%) страдали ожирением [4]. По данным Министерства здравоохранения Российской Федерации, в 2015 г. ожирением страдали 1,31 млн жителей нашей страны, в 2016 г. — 1,39 млн, и данные показатели сохраняют устойчивую тенденцию к увеличению. Особого внимания заслуживает проблема избыточной массы тела среди детского населения, которая отмечается более, чем у 155 млн детей, при этом у 20 млн в возрасте младше 5 лет выявлено ожирение [2,4]. Все более активно обсуждается влияние ожирения на развитие аллергических заболеваний, в особенности бронхиальной астмы (БА) [7,9,10]. Так, согласно M.Vortmann and M.D.Fisner, среди больных БА до 44% пациентов имеют различную степень увеличения индекса массы тела (ИМТ), при этом, более 60% лиц с ожирением после 12 лет страдают БА [14].

Результаты первого проспективного исследования, подтверждающего роль ожирения в формировании БА были выполнены в США и опубликованы в 1999 г. [6]. Под наблюдением авторов находилась группа, сформированная методом случайной выборки из 85 911 исходно здоровых женщин, среди которых в течение последующих 4 лет проводился учет числа случаев первично диагностированной астмы, позволивший выявить наличие сильной прямой ассоциации между наличием избыточной массы тела и риском развития БА.

Последующий метаанализ более 8 популяционных рандомизированных исследований в разных странах мира подтвердил, что ожирение является одним из важных независимых фактором риска развития БА и атопической реактивности как у детей, так и у взрослых [1,5,7]. Так, в одном из них было показано, что у лиц без аллергического анамнеза в возрасте 18-79 лет по мере увеличения массы тела возрастает риск возникновения сенсибилизации к ингаляционным аллергенам.

Результаты исследования последних лет подтверждают, что наличие ожирения у больных БА ухудшает контроль над симптомами заболевания, повышает риск обострений, способствует развитию нейтрофильного типа воспаления дыхательных путей и снижает эффективность базисной терапии [10,11,13]. При ожирении изменяется биомеханика дыхания и повышается риск развития других коморбидных состояний, в частности, гастро-эзофагиального рефлюкса, сахарного диабета, синдрома ночного апноэ, ухудшающих течение астмы [1,9,11].

Прежде жировая ткань рассматривалась только как энергетический и эндокринный орган, осуществляющий накопление и сохранение энергии. Однако в настоящее время установлено, что адипоциты жировой ткани не только регулируют метаболические процессы, но и активно влияют на функции иммунокомпетентных клеток и сосудистого эндотелия, являясь источником различных биологически активных веществ, гормонов лептина и адипонектина, а также провоспалительных медиаторов (IL-6, IL-8, TNF- α и др.), в том числе хемокинов и факторов роста [12,15]. Это позволяет рассматривать жировую ткань как значимую и активную часть иммунной системы, участвующую в патофизиологических механизмах хронического воспаления, включая заболевания аллергического спектра [1].

Процессы гипертрофии адипоцитов, которые отмечаются при ожирении, приводят к их избыточному апоптозу и последующему усилению выраженности воспалительных процессов в легочной ткани, что, в свою очередь, в ряде случаев сопровождается нарушением иммунологической толерантности и образованием аутоАТ, способных на системном уровне поддерживать иммунопатогенез заболевания с последующим формированием порочного круга.

В связи с этим, представляется актуальным и необходимым поиск наиболее значимых иммунологических параметров, которые отражали бы особенности течения БА на фоне ожирения у соответствующей категории пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 109 человек в возрасте от 17 до 58 лет с различной массой тела, 64 из которых имели аллергические заболевания, представленные аллергическим ринитом (АР) интермиттирующего и персистирующего течения ($n=18$) и БА среднетяжелого и тяжелого персистирующего течения ($n=46$). Контрольная группа была представлена 45 условно здоровыми взрослыми лицами в возрасте от 17 до 45 лет. Критериями включения в исследование явилось отсутствие аутоиммунных, онкологических заболеваний, сахарного диабета, а также приема системных ГКС.

Общее клиническое обследование пациентов включало методы объективного осмотра, измерение антропометрических показателей с определением ИМТ ($\text{кг}/\text{м}^2$) в соответствии с критериями ВОЗ и оценку клинико-анамнестических данных.

Лабораторные методы включали биохимические и иммунологические исследования. Всем исследуемым пациентам определяли биохимические показатели крови (холестерин и его фракции) и СОЭ по Вестергрену. В сыворотках крови методом ИФА (ЗАО «Вектор-Бест») определяли содержание общего IgE и С-реактивного белка (СРБ), а также спонтанную и ФГА индуцированную продукцию цитокинов IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α клетками цельной крови. Кроме того, методом твердофазного ИФА определяли содержание IgE-АТ к некоторым тканевым антигенам — кератину, коллагенам III и VI типов, миозину и эластину. Сывороточное содержание лептина определяли методом «сэндвич» ИФА с использованием коммерческих тест-систем производства DRG.

Статистическую обработку количественных данных проводили с помощью параметрических и непараметрических методов вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ «Statistica6,0» (StatSoft, USA). Критической величиной уровня значимости считали 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных антропометрического анализа все обследуемые лица были распределены на 4 группы: 1 — условно здоровые лица с нормальными значениями ИМТ, не имеющие аллергических реакций в анамнезе ($n=19$); 2 группа — лица с избыточной массой тела (предожирение) и ожирением I и II степени, соответственно ($\text{ИМТ} > 25 \text{ кг}/\text{м}^2$) без аллергических заболеваний ($n=26$); 3 группа — больные с аллергическими заболеваниями и нормальной массой тела ($n=19$); 4 группа — больные с аллергическими заболеваниями, имеющие избыточную массу тела и ожирение ($n=45$).

Данные клинико-лабораторного исследования показали, что все пациенты с БА и высокими значениями ИМТ характеризовались дислипидемией с повышением содержания общего холестерина [$\text{Ме} (25\%; 75\%) = 5.63 (4.8; 6.2) \text{ ммоль}/\text{л}$], увеличением индекса атерогенности, составившим 3,5 (2,3; 4,8) и показателями СОЭ = 11.5 (5; 16) мм/ч.

Уровень общего IgE оказался более высоким у пациентов с atopическими заболеваниями [219 (62; 390) МЕ/мл], достоверно отличаясь от здоровых лиц [14 (8; 54) МЕ/мл] независимо от величины ИМТ.

Содержание острофазовых показателей — СРБ [2098 (1335; 3000) нг/мл] и СОЭ [11.5 (5; 16) мм/ч] у взрослых пациентов с ожирением также превышало показатели группы сравнения [744 (660; 1011) нг/мл, 5 (5; 5) мм/ч, соответственно] как у лиц с аллергопатологией, так и при отсутствии таковой.

При анализе содержания цитокинов в супернатантах культивированных клеток крови было установлено, что уровень спонтанной продукции TNF- α и IL-10 у лиц с нормальной массой тела не превышал среднестатистических значений нормы вне зависимости от наличия аллергического заболевания [4,9 (4,7; 7) нг/мл, 15 (4; 27) нг/мл], но был достоверно увеличен у лиц с избыточной массой тела [32 (18; 51) и 12,6 (11; 16) нг/мл] и существенно возрастал среди пациентов с аллергопатологией [44,5 (12; 76) и 21,4 (9,8; 30) нг/мл, соответственно]. Следует отметить, что у пациентов с

аллергическими заболеваниями, имеющими избыточную массу тела и ожирение, выявлен наиболее высокий уровень спонтанной продукции Th2 цитокина IL-4 [8,9 (3;5,9) нг/мл] и, напротив, более низкая степень продукции регуляторного IL-17 [31 (18;44) нг/мл], чего не наблюдалось у больных аллергией с нормальной массой тела [1,7 (0,5; 0,3) нг/мл и 79 (25;89) нг/мл, соответственно].

При дальнейшем разделении группы с аллергическими заболеваниями на АР и БА и сравнительном анализе исследуемых показателей оказалось, что содержание IL-4 и TNF-а не отличалось между данными нозологическими формами, но их повышенные значения определялись только наличием избыточной массы тела или ожирения ($p=0,009$). При этом сывороточное содержание СРБ оказалось наиболее высоким у пациентов с БА [2850 (1560;2571) нг/мл], достоверно отличаясь от АР [920 (3,7;2040) нг/мл] только в группе больных, имеющих ожирение ($p=0,02$).

Ранее мы сообщали об обнаружении противотканевых IgE-АТ у больных БА, частота выявления которых была ассоциирована с тяжестью течения и длительностью заболевания [3]. Дальнейшее исследование IgE-АТ аутореактивности при аллергических заболеваниях позволило в нашей работе установить достоверно более высокое содержание данных АТ к отдельным из антигенов — к антигену кератина и миозина у пациентов с БА в сравнении с показателями, выявленными у больных с АР и у здоровых лиц. При этом, наиболее высокое содержание ауто-АТ при БА было выявлено к АГ эпителиальной ткани — кератину, антитела к которому среди пациентов с избыточной массой тела и ожирением были выше почти в 2 раза ($p<0,5$). Кроме того, была выявлена положительная корреляция между уровнем IgE-АТ к кератину и величиной ИМТ у больных тяжелой формой БА в сочетании с ожирением ($R=0,58$; $p=0,01$).

Одним из важных медиаторов жировой ткани, посредством которого может реализовываться влияние ожирения на патогенез аллергических заболеваний, является лептин. В этой связи мы определяли содержание лептина в сыворотках крови всех обследуемых лиц. Уровень лептина у больных БА был положительно связан с ИМТ ($R=0,4$) и оказался достоверно выше при сочетании БА и ожирения [48 (28; 60) нг/мл] в сравнении с больными БА и нормальной массой тела [18,6 (1,8; 44) нг/мл, $p<0,05$]. Содержание лептина у больных АР [6,1(0,3; 9,2) нг/мл] и у здоровых лиц [6,2 (2; 91) нг/мл] было сопоставимо и не зависело от массы тела ($p=0,84$).

Таким образом, клинический фенотип БА в сочетании с ожирением характеризуется избыточным содержанием СРБ, лептина на фоне повышенной спонтанной продукции IL-4 и TNF- α , свидетельствующих об активации провоспалительного каскада на системном уровне, а также сопровождается повышенным уровнем продукции sIgE аутоАТ к кератину, что в совокупности отражает более выраженный характер реактивного воспалительного процесса и снижения регуляторной функции иммунной системы у данной категории пациентов.

Проведенное нами исследование показало, что лица, имеющие избыточную массу тела, характеризуются повышенным уровнем острофазовых показателей (СОЭ, СРБ) и провоспалительных цитокинов (TNF- α) в сыворотке крови, подтверждая этим участие системного хронического воспаления в патогенезе ожирения.

Кроме того, у больных с аллергическими заболеваниями (АР и БА) наличие ожирения позволяет выделить отдельный патофизиологический эндотип, поскольку сопровождается более высоким уровнем лептина, острофазовых показателей и провоспалительных медиаторов (TNF- α), а также повышенной спонтанной продукцией клетками крови IL-4, как показателя избыточной активации Th2 типа иммунных реакций на фоне сниженного уровня индуцированной продукции IL-17, в сравнении с пациентами, имеющими нормальную массу тела.

Полученные нами данные свидетельствуют о наличии патогенетической взаимосвязи между аллергическим воспалением, аутореактивностью и хроническим воспалением, обусловленным ожирением, и влиянием последнего на иммунопатологические процессы в органах дыхания. Все вышесказанное определяет необходимость дальнейших исследований и последующего выделения самостоятельных клинико-патогенетических фенотипов не только БА, но и других форм алергопатологии на фоне сопутствующего ожирения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Астафьева Н.Г., Гамова И.В. и др. Ожирение и бронхиальная астма. Лечащий врач. 2014, 5:100-110.
2. Гервазиева В.Б., Мазурина С.А., Лысогора В.А. Аллергические заболевания у детей с повышенной массой тела и ожирением. Вопросы практической педиатрии. 2017, 12(4):54-58.
3. Гервазиева В.Б., Сврановская В.В., Конищева А.Ю. Связь аллергических заболеваний с аутоиммунитетом. Пульмонология. 2013, 6:72-78.
4. Ожирение и избыточный вес. Информационный бюллетень ВОЗ. 2016, июнь, №311.
5. Beuther D.A., Sutherland E.R. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007, 175: 661-666.
6. Camargo C.A. Jr., Weiss S.T., Zhang S. et al. Prospective study of body mass index, weight change, and risk of adult-onset asthma in women. Arch. Intern. Med. 1999, 159:2582-2588.
7. Flaherman V.I., Rutherford G.W. A meta-analysis of the effect of high weight on asthma. Arch. Dis. Child. 2006. 91(4):334-339.
8. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (updated 2016). Available from: www.ginasthma.org.
9. Gibson P.G. Obesity and asthma. Ann. Am. Thorac. Soc. 2013; 10: 138-142. doi: 10.1513/AnnalsATS.201302-038AW.
10. Mosen D.M., Schatz M., Magid D.J., Camargo C.A. Jr. The relationship between obesity and asthma severity and control in adults. J. Allergy Clin. Immunol. 2008; 122: 507-511.
11. Novosad S., Khan S., Wolfe B., Khan A. Role of obesity in asthma control, the obesity- asthma phenotype. J. Allergy. 2013; 2013:538642.
12. Sood A., Shore S.A. Adiponectin, leptin, and resistin in asthma: basic mechanisms through population studies. J. Allergy. 2013; 2013: Article ID 785835.
13. Sutherland E.R., Goleva E., Strand M. et al. Body mass and glucocorticoid response in asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2008, 178(7): 682-687.
14. Vortmann M., Eisner M.D. BMI and health status among adults with asthma. Obesity (Silver Spring). 2008. 16(1): 146-152. doi: 10.1038/oby.2007.7.
15. Wajchenberg B.L., Giannella-Neto D. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. Horm. Metab. Res. 2002. 34(11-12): 616-621.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

К.М.Курбонов^{1,2}, Е.Г.Симонова^{3,4}, Н.Н.Филатов^{3,5}

ОСОБЕННОСТИ СЕЗОННОСТИ БРУЦЕЛЛЕЗА СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН

¹Таджикский национальный университет, ²Таджикский НИИ профилактической медицины, Душанбе, Республика Таджикистан; ³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, ⁴Центральный НИИ эпидемиологии, ⁵НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Изучение современных проявлений сезонности бруцеллеза среди населения Республики Таджикистан. **Материалы и методы.** Данные официальной статистики, а также результаты ранее проведенных исследований по оценке риска инфицирования населения. Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ внутригодовой динамики заболеваемости за период с 1997 по 2016 гг. в зависимости от наиболее значимых социальных и природных факторов риска. Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием методов биостатистики, которые включали определение средней арифметической, медианы, стандартных ошибок и доверительных интервалов сравниваемых средних величин ($p < 0,05$). **Результаты.** Показано влияние на характер внутригодовой динамики заболеваемости социально-экономических преобразований, в том числе приватизации коллективных животноводческих хозяйств, сопровождающейся массовым перемещением сельскохозяйственных животных в частные владения, утратой практики планирования случек животных, а также изменений природно-климатических условий. На фоне интенсификации овцеводства выявлена тенденция к сглаживанию сезонности и смещению максимального уровня заболеваемости бруцеллезом населения на весенний период. **Заключение.** Современные особенности сезонности бруцеллеза в Республике Таджикистан

обуславливают необходимость применения дифференцированного подхода к планированию и проведению профилактических мероприятий на различных территориях страны.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 63—67

Ключевые слова: бруцеллез, Таджикистан, заболеваемость населения, сезонность, социальные и природно-климатические факторы риска

K.M.Kurbonov^{1,2}, E.G.Simonova^{3,4}, N.N.Filatov^{3,5}

FEATURES OF SEASONAL MANIFESTATION OF BRUCELLOSIS INFECTION AMONG THE POPULATION OF THE REPUBLIC OF TAJIKISTAN

¹Tajik National University, ²Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Republic of Tajikistan; ³Sechenov First Moscow State Medical University, ⁴Central Research Institute of Epidemiology, ⁵Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

The aim of this work was to study modern manifestations of seasonal brucellosis among the population of the Republic of Tajikistan. *The materials and methods:* of the study were the official statistics, as well as the results of previously performed studies on the risk assessment of the incidence in population. A retrospective epidemiological analysis of annual incidence rate for the period from 1997 to 2016 was conducted, depending on the most significant social and environmental risk factors. *Results.* The article shows the impact on the annual incidence rate of socio-economic transformations, including the privatization of collective livestock farms, accompanied by the massive movement of farm animals to private ownership, the loss of practice in animal breeding, and changes in environmental and climatic conditions. Against the background of the intensification of sheep breeding, there is a tendency in seasonality smoothing and shifting the maximum levels of population incidence of brucellosis to the spring season. *Conclusion.* The modern features of seasonal manifestation of brucellosis infection in the Republic of Tajikistan make it necessary to apply a differentiated approach to planning and conducting preventive measures in various areas of the country.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 63—67

Key words: brucellosis, Tajikistan, population incidence, seasonal manifestation, social risk factors, environmental and climatic risk factors

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи в улучшении эпизоотической и эпидемиологической ситуации по бруцеллезу, достигнутые за последнее десятилетие в Республике Таджикистан, проблема продолжает оставаться актуальной [4,8].

Таджикистан относится к государствам с быстро растущим населением, численность которого в настоящее время вышла за пределы 8 млн человек. Являясь аграрно-индустриальной страной, где сельское хозяйство, в котором занята практически половина трудоспособного населения, обеспечивает около 30% объема ВВП, уровень заболеваемости бруцеллезом остается по-прежнему высоким и по данным 2016 г. достигает 11 случаев на 100 тысяч населения [1]. Следует также учитывать, что 74% населения, проживая в сельской местности, в большей или меньшей степени подвергается риску заражения бруцеллезом [5].

В этих условиях особую значимость приобретают эпизоотологический и эпидемиологический надзор и контроль, так как они не только снижают бремя бруцеллеза, но и способствуют повышению продуктивности животноводства и, соответственно, экономическому росту страны.

Известно, что происходящие изменения в социальных и природно-климатических условиях влияют на проявления эпизоотического и эпидемического процессов зоонозных инфекций, и в том числе бруцеллеза. При этом особого внимания заслуживает изучение современных проявлений сезонности бруцеллеза. Данный вопрос приобретает особую актуальность в условиях изменения технологий ведения сельского хозяйства, интенсификации животноводства, и прежде всего овцеводства,

которое вследствие своеобразных природных условий рассматривается одной из ведущих отраслей Таджикистана [9]. В последние годы для повышения плодovitости поголовья в республике ведется активная селекция наиболее рентабельных гиссарских пород овец [7].

Принимая во внимание вышеизложенное, цель настоящего исследования состояла в выявлении современных особенностей сезонных проявлений бруцеллеза среди населения Республики Таджикистан и обосновании необходимости применения дифференцированного подхода при планировании профилактических мероприятий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для достижения поставленной цели по материалам Службы государственного санитарно-эпидемиологического надзора (форма № 1) проведен ретроспективный эпидемиологический анализ сезонной заболеваемости бруцеллезом населения Республики Таджикистан за период с 1997 по 2016 гг. В анализ включены данные о 18 560 случаях бруцеллеза, зарегистрированных среди людей во всех административно-территориальных образованиях республики. Для изучения особенностей сезонности бруцеллеза проанализирована внутригодовая динамика заболеваемости населения за указанный период в целом, а также за отдельные периоды для выявления возможного влияния факторов риска. Влияние климатических факторов на внутригодовую динамику изучалось путем сравнения показателей заболеваемости бруцеллезом, зарегистрированных в наиболее жаркий и наиболее холодный годы. По данным Агентства по статистике при Президенте Республики Таджикистан (<http://www.gksintranet.tj/ecostat/Dashboard.aspx?type=B1>), самым теплым за период с 1990 г. был сезон 2001-2002 гг. со среднегодовой температурой воздуха более 10,5°C, а самым холодным — сезон 2008-2009 гг. (около 8,4°C).

Влияние особенностей ведения животноводства изучалось путем сравнения внутригодовой динамики заболеваемости за два равных по продолжительности периода — до и после приватизации животноводческих хозяйств, т.е. за 1997-2005 гг. и 2006-2014 гг. Кроме того, проявление сезонности изучено в разрезе административно-территориального деления республики, т.е. в районах республиканского подчинения (РРП) со столицей Таджикистана — городом Душанбе, Горно-Бадахшанской автономной области (ГБАО), Хатлонской и Согдийской областях, различающихся по ландшафтным условиям, особенностям ведения животноводства и степени риска инфицирования населения бруцеллезом (РИНБ). В качестве территорий эпидемиологического риска рассматривались РРП с г. Душанбе, а также ГБАО, имевшие высокие значения РИНБ (24,5 — 62,4) [6].

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием методов биостатистики, которые включали определение средней арифметической, медианы, стандартных ошибок и доверительных интервалов сравниваемых средних величин (при $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование показало, что по данным статистического наблюдения заболеваемость бруцеллезом, регистрируемая среди населения Республики Таджикистан в период с 1997 по 2016 гг., находилась в среднем на уровне 13 случаев на 100 тыс. населения. Вплоть до 2006 г. в Республике Таджикистан наблюдалось расширение географии регионов, эндемичных по бруцеллезу. Так, если в 1999 г. случаи бруцеллеза среди населения регистрировались в 46 из 65 административно-территориальных образований страны, то к 2003 г. таких неблагополучных территорий было уже 59 ($p < 0,05$). Показатели заболеваемости колебались от 12 на 100 тыс. населения в Хатлонской области до 41 на 100 тыс. в ГБАО. Однако реальный уровень заболеваемости многократно превосходит приводимые цифры, особенно на территориях с высоким РИНБ, где среди сельскохозяйственных животных, преимущественно мелкого рогатого скота (МРС), выявляется высокая серопревалентность, достигающая 5 и более % [6].

Изучение внутригодовой динамики заболеваемости бруцеллезом населения Республики Таджикистан в целом за период 1996-2016 гг. показало, что достоверное увеличение числа регистрируемых случаев начиналось в марте, наибольшее количество заболевших отмечалось в апреле — августе с пиком заболеваемости в июне.

Таким образом, подтвержден факт наличия весенне-летне- и осенней сезонности бруцеллеза, а также высокий риск инфицирования населения, связанный с периодами окота и отела сельскохозяйственных животных. Резко выраженная сезонность указывает на доминирование в Таджикистане очагов козье-овечьего типа и, соответственно, преимущественную передачу возбудителя инфекции контактным путем [6].

При рассмотрении внутригодовой динамики заболеваемости установлено, что начиная с 2012 г. наблюдается тенденция к сглаживанию сезонности, которая выражается в уменьшении амплитуды подъема заболеваемости и различий в показателях заболеваемости в пиковых месяцах. Так, разница между долей заболевших в мае и июне месяцах после 2012 г. (2012 — 2016 гг.) в сравнении с 1997 — 2011 гг. сократилась в 2 раза ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ внутригодового распределения заболеваемости в наиболее жаркий и наиболее холодный сезоны, а также в до- и послеприватизационный период в животноводстве показал наличие тенденции к смещению пика заболеваемости населения с июня на май месяц.

Аналогичную ситуацию наблюдали в Республике Дагестан Российской Федерации в 1991-2004 гг. [3], которая по своим климато-географическим и социально-экономическим характеристикам имеет ряд сходных черт с Республикой Таджикистан. К таким чертам следует отнести наличие высокогорных и предгорных поясов, способствующих развитию многоотраслевого сельского хозяйства, в основном животноводства, преобладающим направлением которого является мясное и молочное скотоводство и, прежде всего, овцеводство. Сдвиг максимального подъема заболеваемости бруцеллезом с летних месяцев на весну объясняют преимущественным нахождением скота в частном секторе животноводства, где в отличие от общественных животноводческих предприятий не соблюдаются периоды случки, окота и отела. Корреляционную связь уровня помесячной заболеваемости и различных погодных условий также наблюдали в Китайской Народной Республике [11].

Еще одной причиной изменения сезонности в Республики Таджикистан в последние годы являются активные работы, направленные на интенсификацию овцеводства. Именно овцеводство позволяет рационально использовать особенности страны, 93% площади которой занимают горы Памира, Тянь-Шаня, Гиссаро-Алая и др. горных систем. С учетом необходимости сокращения дефицита мяса в настоящее время в республике первостепенное значение придается развитию мясосальных пород МРС, представителем которых является самая крупная гиссарская порода овец [7]. Ее продуктивность повышается за счет изменений условий выпаса и содержания, что обеспечивает раннюю случку ярок и дополнительные ягнения. Практиковавшийся ранее плановый окот овец в марте смещается на зимние и даже осенние месяцы. В результате подъем заболеваемости, регистрируемой среди людей, наблюдается раньше, а сама сезонность сглаживается и приобретает иной характер.

Установлено также, что сезонные проявления бруцеллеза различаются и по территориям. Так, в РРП и г. Душанбе, где регистрируется самая высокая заболеваемость, в последние годы наблюдаются весенний и зимний подъемы. Здесь, также как и в Хатлонской области, сконцентрировано основное поголовье сельскохозяйственных животных (64%) [6].

В ГБАО, расположенной в восточной части страны и характеризующейся более холодным климатом и высокогорьем, пик заболеваемости падает на июль, что, скорее всего, связано с климатическими особенностями и, соответственно, более поздним сезоном окота животных. В Согдийской области, где выявлены

минимальные показатели РИНБ (до 3,15), внутригодовая динамика заболеваемости практически не изменилась, максимальное число случаев регистрировалось в июне месяце.

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало изменение сезонности бруцеллеза под влиянием комплекса социально-экономических и природно-климатических факторов. Одним из них стала приватизация в сельскохозяйственном секторе, которая приобрела масштабность в Республике Таджикистан с начала века. До этого времени все еще существовала унаследованная со времен Советского Союза практика регулирования периодов случки, окота и отела животных. Рост частных животноводческих хозяйств и преимущественно стойловое содержание скота в подворьях способствовали утрате данной практики, что не могло не повлиять на сезонные проявления бруцеллеза.

Влияние климатических факторов, описываемое в последнее время исследователями, имеет характер опосредованного воздействия на изменение сезонности бруцеллеза. Изменение климата приводит к деградации пастбищ [2], что способствует преимущественно стойловому содержанию животных и более частым контактам с ними людей. Ключевую роль в этом случае по-прежнему играет способ содержания животных [10], т.е. свободное или на привязи, где свободное содержание способствует широкой циркуляции возбудителя среди животных и повышению риска инфицирования людей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агентство по Статистике при Президенте Республики Таджикистан. Животноводство в частном и общественном секторе, отчетная форма №24. <http://www.stat.tj/ru/database>.
2. Жолдошева Э., Ручевская И., Семерня Л., Даиров И., Кожакметов П., Бариева А., Маскаев А., Митрофаненко Т., Алексеева Н. Адаптация к изменению климата в горных районах Центральной Азии. Серия обзоров по адаптации в горных районах. ООН окружающая среда, ГРИД-Арендал, РГЦЦА. Найроби, Вена, Арендал, Бишкек. 2017. www.unep.org, www.grida.no.
3. Исаев А.Н. Эпидемиологические особенности бруцеллеза в Республике Дагестан на современном этапе. Дисс. канд. мед. наук. Махачкала. 2006.
4. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Вилинская С.В., Зайцев А.А., Куличенко А.Н. Эпидемическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации и государствах — участниках содружества независимых государств. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2016, 1(14): 68-74.
5. Курбонов К.М., Саторов С.С. Факторы риска передачи бруцеллеза среди населения в Республике Таджикистан. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014, 4:28-32.
6. Курбонов К.М., Саторов С.С., Симонова Е.Г., Филатов Н.Н. Современные эпизоотолого-эпидемиологические особенности бруцеллеза в Республике Таджикистан. Журн. микробиол. 2016, 3:31-37.
7. Рахимов Ш.Т., Бобокалонов И.И. Основные направления повышения плодovitости овец гиссарской породы. Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2015, 6 (56):157-159.
8. ФАО. 2015. Региональное совещание по борьбе с бруцеллезом в Центральной Азии и Восточной Европы. Рим.
9. Хайитов А.Х., Раджабов Н.А., Джураева У.Ш. Овцеводство Таджикистана. Овцы, козы, шерстяное дело. 2012, 1:26-29.
10. Kellar J., Marra R., Martin W. Brucellosis in Ontario: a case control study. Can. J. Comp. Med. 1976, 40:119.
11. Li Y.J., Li X.L., Liang S. et al. Epidemiological features and risk factors associated with the spatial and temporal distribution of human brucellosis in China. BMC Infect. Dis. 2013.13:547. doi: 10.1186/1471-2334-13-547.

И.А.Ленева¹, А.Ю.Егоров^{1,2}, И.Н.Фалынскова¹, Н.Р.Махмудова¹, Н.П.Карташова¹, Е.А.Глубокова¹,
Н.О.Вартанова¹, А.В.Поддубиков¹

ИНДУКЦИЯ ВТОРИЧНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ У МЫШЕЙ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ПАНДЕМИЧЕСКИМ И ЛАБОРАТОРНЫМ ШТАММАМИ ВИРУСА ГРИППА H1N1

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; ²НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева, Санкт-Петербург

Цель. Разработка и характеристика экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии, вызываемой *S. pneumoniae* и различными штаммами *S. aureus* после гриппозной инфекции, индуцированной пандемическим и лабораторным штаммами под-типа H1N1, а также их реассортантом. **Материалы и методы.** Мышей линии BALB/c инфицировали вирусами гриппа пандемическим и адаптированным к мышам А/Калифорния/04/2009, А/Пуэрто Рико /8/34 и их реассортантом NIBRG-121xp с последующим заражением различными штаммами. Патогенез инфекций оценивали по выживаемости и снижению массы животных, титру вируса и плотности бактерий в легких. **Результаты.** Показано, что заражение мышей тремя штаммами вируса гриппа H1N1 с сопоставимым уровнем патогенности приводит к различной степени тяжести вторичной бактериальной инфекции. При этом наибольшей способностью к нарушению антибактериального иммунитета обладал адаптированный к мышам пандемический вирус А/Калифорния/04/2009. **Заключение.** Разработана экспериментальная модель постгриппозной бактериальной пневмонии, индуцированной тремя штаммами вируса гриппа H1N1 и различными штаммами *S. aureus* или *S. pneumoniae*. Охарактеризована способность вирусов провоцировать бактериальную суперинфекцию различной степени тяжести.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 68—74

Ключевые слова: грипп; вирус гриппа; вторичные пневмонии после гриппозной инфекции, *S. aureus*, *S. pneumoniae*

И.А.Ленева¹, А.Ю.Егоров^{1,2}, И.Н.Фалынскова¹, Н.Р.Махмудова¹, Н.П.Карташова¹, Е.А.Глубокова¹,
Н.О.Вартанова¹, А.В.Поддубиков¹

INDUCTION OF SECONDARY BACTERIAL PNEUMONIA IN MICE INFECTED WITH PANDEMIC AND LABORATORY STRAINS OF THE H1N1 INFLUENZA VIRUS

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia

Aim. In this study we developed and characterized a mouse model of secondary *S. aureus* and *S. pneumoniae* pneumonia following influenza virus infection with H1N1 pandemic and laboratory strains and their reassortment. **Materials and methods.** BALB/c mice were infected intranasally with A/California/04/2009/(H1N1 pdm), A/Puerto Rico/8/34 or their reassortment NIBRG-121xp followed by different strains of *S. aureus* or *S. pneumoniae*. The pathogenicity of infection was assessed by mouse survival and weight change, viral titre and bacterial count in the lungs. **Results.** It was shown that the infection of mice with three strains of the H1N1 influenza virus with a comparable level of pathogenicity leads to a different severity of secondary bacterial infection. The mouse adapted A/California/04/2009 pandemic strain possessed the greatest ability to alter antibacterial immunity. **Conclusion.** An experimental model of post-influenza bacterial pneumonia utilizing three strains of the H1N1 influenza virus and various strains of *S. aureus* or *S. pneumoniae* was established. The ability of viruses to provoke bacterial superinfection of different severity is characterized.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 68—74

Key words: influenza, influenza virus, secondary bacterial pneumonia after influenza, *S. aureus*, *S. pneumoniae*

ВВЕДЕНИЕ

Большая часть смертельных исходов от гриппа обусловлена вторичными бактериальными осложнениями, среди которых ведущую роль занимают пневмонии. Показано, что распространенность пневмоний значительно увеличивается после эпидемий гриппа, достоверное увеличение смертности в результате пневмоний фиксировалось во время пандемий 1918, 1957, 1968 и 2009 гг. [3,8,12,14]. Во время последней пандемии, вызванной вирусом гриппа А H1N1 в 2009 г., 25-56% тяжелых форм заболеваний и смертельных исходов были ассоциированы со вторичной пневмонией, из них 14-46% привели к смертельным исходам [3,8]. Вторичная инфекция *S. pneumoniae* наиболее часто коррелировала с тяжестью заболевания [13]. В то же время, в исследовании 838 критически больных детей в США показано, что в течение 72 ч после госпитализации в отделение интенсивной терапии у 33% детей развивалась бактериальная суперинфекция, причем в 26% случаев в качестве этиологического агента были выявлены *Staphylococcus aureus*, из которых 48% относились к метициллинрезистентным штаммам (MRSA) [13].

Несмотря на широкое внедрение сезонных гриппозных вакцин, противовирусных препаратов и антибиотиков, проблема бактериальных осложнений при гриппе не перестала быть актуальной, более того, развитие резистентности бактериальной флоры к современным антибиотикам может обострить данную проблему при возникновении новой пандемии гриппа. В настоящее время ВОЗ ставит задачу снижения пневмоний после гриппозной инфекции как одну из первоочередных, что отражено в целом ряде документов, включая «Программу исследований ВОЗ по гриппу с позиции общественного здравоохранения» [8,15], в которых подчеркивается важность проведения клинических и научных исследований, направленных на выявление прогностических маркеров тяжести пневмоний после гриппозной инфекции как приоритетного направления, которое заслуживает немедленного внимания. Моделирование у мышей пневмонии инфицированием их вирусом гриппа А с последующим заражением *S. pneumoniae* и *S. aureus* проведено в нескольких ведущих лабораториях мира и опубликовано в статьях [5,7, 9, 11]. Ранее нами также была разработана и охарактеризована мышинная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) и *S. aureus*, в которой был выявлен летальный синергизм между патогенами, отмечаемый в эпидемиологических наблюдениях [2]. Вирус гриппа вносит ведущий вклад в возникновение летального синергизма при сочетанном заражении двумя патогенами. В связи с этим, выявление корреляции между патогенезом инфекции и биологическими свойствами вирусов гриппа является важнейшим подходом для определения взаимодействия между вирусным и бактериальным агентами в патогенезе вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции. Кроме того, использование вирусов различного происхождения может служить инструментом для выявления роли отдельных вирусных белков в патогенезе синергизма для определения его механизма с целью дальнейшей идентификации мишени для интервенции данной болезни.

Цель настоящей работы — разработка и характеристика экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии, вызываемой *S. pneumoniae* и различными штаммами *S. aureus* после гриппозной инфекции, индуцированной пандемическим и лабораторным штаммами подтипа H1N1, а также их реассортантом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали клетки MDCK, полученные из коллекции НИИ вирусологии. Для моделирования гриппозной инфекции были использованы штамм вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009), полученный из ВОЗ, а также лабораторный штамм вируса гриппа А/Пуэрто Рико /8/34(H1N1) и реассортант NIBRG-121хр (А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009)ХА/Пуэрто Рико /8/34(H1N1) (2:6), полученные из музея НИИ гриппа. Вирус А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1) адаптировали к мышам путем 5 последовательных пассажей через легкие. Для инфицирования животных вирусы выращивали в аллантоисной полости 9-дневных куриных эмбрионов. Культуры штаммов *S. pneumoniae* №3405, вакцин-

ный штамм *S.aureus* №1986, *S.aureus* №329, *S.aureus* №884 получены из коллекции НИИВС им. И.И.Мечникова в лиофилизированном состоянии. Для восстановления жизнеспособности культуры в ампулу добавляли 0,5 мл питательного бульона ГРМ-бульон для *S.aureus* и сердечно-мозговой бульон (Mast Group Ltd, Великобритания). Суспензию переносили в пробирку с 2 мл соответствующего бульона и инкубировали 4 ч при температуре 37°C. Затем осуществляли посев на питательный агар Мюллера-Хинтона (HiMedia Laboratories, Индия) для *S.aureus* и ГРМ-агар с добавлением 5% лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб») для *S.pneumoniae*. Чашки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C (в 5,5% CO₂ среде для *S.pneumoniae*). В исследовании использовали второй пассаж бактерий после регенерации штамма. Рабочие разведения бактериальной суспензии готовили с использованием денситометра Densi-La-Meter («PLIVA-Lachema Diagnostika», Словакия). За 1x10⁹ бактерий в 1 мл объема принимали 0,8 ЕД мутности по McFarland.

Мышей (BALB/C, самки, массой 20-22 г) получали из питомника «Андреевка» (Московская обл.) и содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария. Мышей инфицировали интраназально под легким наркозом указанными в каждом эксперименте дозами вирусов гриппа. Далее на 4 день после вирусного заражения мышей инфицировали повторно интраназально различными дозами *S.pneumoniae* и *S.aureus* (в объеме 0,05 мл). Клиническую тяжесть инфекции у животных оценивали, учитывая смертность от инфекции и изменение веса, которое рассчитывали, как описано [2]. В указанные дни после инфицирования в каждой группе забивали по три мыши, в стерильных условиях извлекали легкие. После манипуляций, описанных в [2], супернатант отбирали для определения бактериальной плотности и определения инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK в 96-луночных планшетах, как описано в [2]. Титр вируса определяли по 4 повторностям каждой пробы и выражали в lgТЦИД₅₀/0,1 мл.

Для определения плотности бактерий из полученных образцов гомогенизированных легких готовили серийные разведения и осуществляли прямой высеив на чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтона для *S.aureus* и ГРМ-агар с добавлением 5% лошадиной крови для *S.pneumoniae*. Учет КОЕ проводили после 18 часов инкубации при температуре 37°C (в 5,5% CO₂ среде для *S.pneumoniae*). Количество выросших колоний умножали на степень разведения и коэффициент, обратный количеству посеянного материала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов была изучена патогенность вирусов гриппа, далее использованных для разработки экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции. Для проведения экспериментов нами были использованы вирусы гриппа подтипа H1N1: адаптированный к мышам пандемический, А/Калифорния/04/2009 МА, лабораторный штамм вируса гриппа А/Пуэрто Рико /8/34, известного своей вирулентностью для мышей, и их реассортанта NIBRG-121хр (А/Калифорния/04/2009 Х А/Пуэрто Рико /8/34 (2:6), содержащий поверхностные белки HA и NA от А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки от А/Пуэрто Рико /8/34. В предварительных опытах были определены для каждого вируса летальные дозы на мышах (МЛД₅₀) и выражены в ТЦИД₅₀. Изучение патогенности вирусов у мышей проводили при заражении мышей 5 МЛД₅₀ вирусов А/Калифорния/04/2009МА, А/Пуэрто Рико /8/34, NIBRG-121хр или аллантаоисным вирусом А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009). На 5 день после инфицирования у животных получали легкие и определяли в них титр вируса в культуре клеток MDCK, а также фиксировали потерю веса в каждой группе мышей.

Проведенные нами исследования показали, что инфицирование вирусом А/Пуэрто Рико /8/34 приводило к смертности мышей, значительной потере веса (22%) и вирусной репродукции в легких животных. Пандемический вирус гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) без предварительной адаптации к мышам не обладал летальной активностью, что коррелировало с его низкой репро-

дукцией в легких, однако проведенная нами адаптация этого вируса путем 5 пассажей через легкие мышей привела к получению патогенного варианта, инфицирование которым вызывало смертность животных, потерю ими веса (23%), а также репродукцию вируса в легких. В результате была создана модельная пара вирусов А/Калифорния/04/2009МА и А/Пуэрто Рико /8/34, достоверно не отличающихся по летальной и репродукционной активности у мышей. В качестве третьего модельного вируса был использован реассортант NIBRG-121хр (А/Калифорния/04/2009 ХА/Пуэрто Рико /8/34 (2:6), содержащий поверхностные белки НА и NA от не адаптированного к мышам вируса А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки от А/Пуэрто Рико /8/34. Несмотря на то, что реассортант вызывал смертность животных, он обладал меньшей патогенностью по сравнению с родительскими штаммами.

Для моделирования инфекции использовались сублетальные заражающие дозы (0,5 МЛД₅₀) трех вирусов: А/Калифорния/04/2009МА, А/Пуэрто Рико /8/34 и NIBRG-121хр. Живые культуры *S. aureus* вводили в одинаковых дозах для заражения. Несмотря на признаки болезни, а также незначительную потерю веса, в группах мышей, зараженных вирусами или бактериями отдельно, все животные остались живы в течение всего периода наблюдения (табл. 1). Полная или частичная гибель наблюдалась в группах, зараженных изученными штаммами *S. aureus* после инфицирования всеми вирусами, за исключением вакцинного штамма *S. aureus* №1986, который вызывал гибель животных только при инфицировании их А/Калифорния/04/2009 МА. Процент смертности и потеря веса в группах зависели от штаммов обоих патогенов. Полная гибель животных с наибольшей потерей веса наблюдалась в группе, инфицированной А/Пуэрто Рико /8/34 с последующим заражением *S. aureus* №884, при индуцировании бактериальной пневмонии *S. aureus* №329 смертность была ниже. При заражении NIBRG-121хр с последующим инфицированием *S. aureus* № 329 или *S. aureus* № 884 смертность животных и потеря веса были ниже по сравнению с аналогичными группами, зараженными А/Пуэрто Рико /8/34, но при этом, как и в случае с А/Пуэрто Рико /8/34, наибольшая смертность (75%) наблюдалась при последовательном заражении вирусом и *S. aureus* №884. При последовательном заражении вакцинным штаммом *S. aureus* №1986 после инфицирования вирусами NIBRG-121хр или А/Пуэрто Рико /8/34, несмотря на фиксируемое снижение веса, все животные оставались живы. Определение титра вируса и плотности бактерий в легких животных выявило, что эти показатели при заражении каждым из патогеном отдельно во всех случаях были достоверно ниже, чем при комбинированном зара-

Таблица 1. Влияние комбинированного заражения различными штаммами *S. aureus* после гриппозной инфекции, вызванной вирусами гриппа H1N1

Схемы заражения	Выживаемость (%)	Титр вируса (lg ТПД ₅₀)	Плотность бактерий (lg КОЕ/мл) в легких
А/Калифорния/04/09МА+ <i>S. aureus</i> 1986	20	5,2±0,2	3,5±0,5
А/Пуэрто Рико /8/34+ <i>S. aureus</i> 1986	100	2,5±0,5	0,5±0,5
Реассортант NIBRG-121хр+ <i>S. aureus</i> 1986	100	2,3±0,4	0,5±0,5
А/Пуэрто Рико /8/34+ <i>S. aureus</i> 884	0	5,3±0,8	4±0,5
А/Пуэрто Рико /8/34+ <i>S. aureus</i> 329	25	5,2±0,3	2,9±0,8
Реассортант NIBRG-121хр+ <i>S. aureus</i> 884	25	4,7±0,8	3,0±0,6
Реассортант NIBRG-121хр+ <i>S. aureus</i> 329	30	4,8±1,0	2,9±0,7
А/Калифорния/04/2009 МА	100	1,8±0,4	-
А/Пуэрто Рико /8/34	100	1,2±0,5	-
Реассортант NIBRG-121хр	100	0,8±0,8	-
<i>S. aureus</i> 1986	100	-	0,72±0,12
<i>S. aureus</i> 329	100	-	0,9±0,3
<i>S. aureus</i> 884	100	-	1,2±0,2

Примечание. В опытах все штаммы использовали для заражения в одинаковых дозах: *S. aureus* 2х10⁸ КОЕ/мл, вирусы в дозе 0,5 МЛД₅₀/0,1мл.

жении (табл.1). Однако при использовании для индуцирования вторичной пневмонии вакцинного штамма *S. aureus* № 1986 титр вируса и плотность бактерий были значительно выше при заражении вирусом А/Калифорния/04/2009 МА, чем при заражении NIBRG-121хр или А/Пуэрто Рико /8/34, что соответствовало данным по смертности животных. Кроме того, плотность бактерий при заражении *S. aureus* №884 была выше, чем в аналогичных группах животных, инфицированных *S. aureus* №329, что также коррелировало с данными по смертности мышей.

Для индуцирования вторичной бактериальной пневмонии использовали *S. pneumoniae* и сублетальные дозы вирусов гриппа (0,5МЛД₅₀) А/Калифорния/04/2009 МА, А/Пуэрто Рико /8/34 и NIBRG-121хр, заражение каждым из которых по отдельности вызывало заболевание у мышей, но не приводило к смертельным исходам. Введение отдельно живых культур *S. pneumoniae* в двух дозах (12,5х10⁶ и 25х10⁶ КОЕ/мл) вызывало гибель 20 и 40% животных соответственно (табл. 2). Последовательное заражение *S. pneumoniae* в обеих дозах после гриппозной инфекции вирусами А/Калифорния/04/2009 МА или А/Пуэрто Рико /8/34, сходными по своей патогенности, вызывало полную гибель мышей. При заражении менее патогенным NIBRG-121хр полная гибель животных наблюдалась при последующем заражении *S. pneumoniae*, в дозе 25х10⁶ КОЕ/мл, снижение дозы заражения *S. pneumoniae* до 12,5х10⁶ КОЕ/мл приводило к снижению гибели и выживанию 25% мышей. Изучение легких мышей выявило, что для всех трех вирусов титр при заражении ими отдельно был достоверно на 2-3 lgТЦИД₅₀ ниже, чем при комбинированном заражении. Несмотря на гибель животных во всех группах, зараженных *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, размножение вируса в легких животных, инфицированных А/Калифорния/04/2009МА, было значительно выше, чем в аналогичных группах, зараженных А/Пуэрто Рико /8/34 и NIBRG-121хр. Плотность бактерий в высевах из легких при комбинированном заражении была примерно в 100 раз выше, чем при отдельном заражении обеими дозами *S. pneumoniae* (табл. 2).

Совокупность полученных данных в разработанной модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной различными штаммами *S. aureus* и *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, позволяет выявить ряд различий в протекании и исходе пневмоний, вызванных как отдельно вирусами гриппа или бактериями, так и их сочетанием. В задачу исследования входило использование в качестве триггеров бактериальной инфекции вирусов гриппа H1N1, сопостави-

Таблица 2. Влияние комбинированного заражения различными дозами *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, вызванной вирусами гриппа H1N1

Схемы заражения	Выживаемость (%)	Титр вируса в легких (lgТЦИД ₅₀)	Плотность бактерий в легких (lg КОЕ/мл)
А/Калифорния/04/09МА+ <i>S. pneumoniae</i> 12,5х10 ⁶ КОЕ/мл	0	4,0±2,0	8,51±0,19
А/Калифорния/04/09МА + <i>S. pneumoniae</i> 25х10 ⁶ КОЕ/мл	0	4,5±2,3	8,93±0,13
А/Пуэрто Рико /8/34+ <i>S. pneumoniae</i> 12,5х10 ⁶ КОЕ/мл	0	2,7±0,3	8,64±0,02
А/Пуэрто Рико /8/34+ <i>S. pneumoniae</i> 25х10 ⁶ КОЕ/мл	0	3,7±0,8	8,63±0,59
NIBRG-121хр+ <i>S. pneumoniae</i> 12,5х10 ⁶ КОЕ/мл	25	2,3±0,3	8,21±0,23
NIBRG-121хр+ <i>S. pneumoniae</i> 25х10 ⁶ КОЕ/мл	0	3,2±1,0	8,21±0,12
А/Калифорния/04/2009 МА	100	1,8±0,4	-
А/Пуэрто Рико /8/34	100	1,5±0,5	-
NIBRG-121хр	100	1,0±1,0	-
<i>S. pneumoniae</i> 12,5х10 ⁶ КОЕ/мл	80	-	6,67±0,58
<i>S. pneumoniae</i> 25х10 ⁶ КОЕ/мл	60	-	7,87±0,03

мых по параметрам патогенности для мышей. С этой целью нами были выбраны классический лабораторный штамм А/Пуэрто Рико /8/34 (H1N1) и адаптированный к мышам штамм А/Калифорния/04/2009 МА (пндм H1N1 2009). Исходный изолят пандемического вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) не обладал летальной активностью у мышей. Однако, после пассажей через легкие мышей вирус приобрел патогенные свойства, схожие с вирусом А/Пуэрто Рико /8/34 (H1N1), что, вероятно, объясняется приобретением им при пассировании мутации D222G в НА, которая обнаруживается в большинстве адаптированных к мышам вирусам А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) [1] и ассоциирована с тяжелыми и смертельными исходами от пневмоний после пандемического гриппа у людей [4]. Реассортант NIBRG-121хр (А/Калифорния/04/2009 Х А/Пуэрто Рико /8/34), содержащий поверхностные белки НА и NA от не адаптированной к мышам А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки от А/Пуэрто Рико /8/34, обладал несколько меньшей патогенностью по сравнению с А/Калифорния/04/2009 МА и А/Пуэрто Рико /8/34, что, возможно, связано с наличием у него НА от неадаптированного вируса А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009). При моделировании вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* №329, *S. aureus* №884 и *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, наблюдалось увеличение смертности мышей по сравнению с инфекцией, вызванной каждым из патогенов в отдельности, что ассоциировалось с увеличением титра вируса и плотности бактерий в легких. Исключением явился наименее патогенный для мышей вакцинный штамм *S. aureus* №1986, который не вызывал смертности при инфицировании животных вирусами А/Пуэрто Рико /8/34 и NIBRG-121хр, но приводил к их гибели при инфицировании не отличающимся от них по патогенности вирусом А/Калифорния/04/2009 МА. Кроме того, у животных, зараженных *S. pneumoniae* после инфекции их А/Калифорния/04/2009 МА, размножение вируса в легких было значительно выше, чем в аналогичных группах, зараженных А/Пуэрто Рико /8/34 и NIBRG-121хр. Данный факт позволяет предположить, что пандемический штамм А/Калифорния/04/2009 МА обладает более сильными факторами патогенности, повреждающими антибактериальную активность системы врожденного иммунитета, чем вирус А/Пуэрто Рико /8/34. Одним из таких факторов может являться минорный белок PB1-F2, обладающий про-апоптотической функцией в отношении фагоцитирующих лейкоцитов и способностью провоцировать вторичные бактериальные осложнения [5,6,10], первичная структура белка которого отличается у взятых в эксперимент лабораторного и пандемического штаммов [6]. Данная гипотеза требует дальнейшего изучения, предусматривающего использование в модели вторичной постгриппозной пневмонии рекомбинантных вирусов с различными модификациями белка PB1-F2. Разработанная нами модель постгриппозной пневмонии с использованием вирусов и бактериальных штаммов с различными свойствами является инструментом для дальнейших исследований в области определения факторов патогенности вируса гриппа, а также для создания нового поколения гриппозных вакцин, способных нивелировать повреждающую функцию факторов патогенности за счет индукции к ним иммунного ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержки Российского Научного Фонда (грант № 18-45-05002 «Вирусоподобные частицы для борьбы с постгриппозными бактериальными инфекциями, 2018-2020 гг. »).

ЛИТЕРАТУРА

1. Краснослободцев К.Г., Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Колобухина Л.В., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Оскерко Т.А., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г. Полиморфизм аминокислот в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта гемагглютинина вируса гриппа А (H1N1)pdm09 у пациентов с летальной вирусной пневмонией 2012-2014 гг. Вопросы вирусологии. 2016, 61(4): 166-171.
2. Ленева И.А., Леонова Е.И., Махмудова Н. Р., Фалынскова И.Н., Федякина И.Т., Зверев В.В., Михайлова Н. А. Разработка экспериментальной модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии. Вопросы вирусологии. 2015, 60(5): 27-31.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1). United States, May-August 2009. MMWR 2009, 58:1-4.

4. Goka A. Mutations associated with severity of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in humans: a systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. *Archives of Virology*. 2014, 159(12):3167-3183.
5. Iverson A.R, Boyd K.L, McAuley J.L. et al. A. Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 2011, 203(6):880-888.
6. Kamal R.P, Alymova I.V, York I.A. Evolution and Virulence of Influenza A Virus Protein PB1-F2. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 29 ;19(1).
7. Lee M.H., Arrecubieta C., Martin F.J. et al. A postinfluenza model of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J. Infect. Dis.* 2010, 201(4):508-515.
8. Legand A., Briand S., Shindo N. et al. Addressing the public health burden of respiratory viruses: the Battle against Respiratory Viruses (BRaVe) Initiative. *Future Virology*. 2013, 8(10): 953-968.
9. McCullers J.A. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19(3):571-582.
10. McAuley J.L., Hornung F., Boyd, K.L. et al. J.A. Expression of the 1918 influenza a virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell. Host. Microbe*. 2007, 2:240-249.
11. McCullers J.A., Rehng J.E. Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. *J. Infect. Dis.* 2002, 186(3):341-350.
12. Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* 2008, 198 (7):962-970.
13. Murray R.J., Robinson J.O., White J.N. et al. Community-acquired pneumonia due to pandemic A(H1N1)2009 influenza virus and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* co-infection. *PLoS One*. 2010, 5(1):e8705.
14. Potter C.W. Chronicle of influenza pandemics. *In: Nicholson K.G., Webster R.G., Hay A.J. (eds). Textbook of Influenza*. London: Blackwell Scientific Publications, 1998:3-18.
15. Shindo N. Making progress on the WHO Public Health Research Agenda for Influenza. *Influenza Other Respi. Viruses*. 2013, 7(2):1-3.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Н.А.Михайлова, Е.М.Зими́на, А.В.Солдатенкова, А.А.Калошин

РАЗРАБОТКА ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Получение, исследование и отбор рекомбинантных антигенов для включения в состав антисинегнойной вакцины. **Материалы и методы.** При использовании в качестве матрицы геномной ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, в результате ПЦР синтезированы гены, кодирующие одни из наиболее изученных антигенов микроорганизма, в частности белки F, L и I наружной мембраны и экзотоксин А. Амплифицированные последовательности клонированы в плазмидных векторах, предназначенных для экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Синтезированные в результате экспрессии рекомбинантные белки очищали в колонках с никель-активированным сорбентом. Подлинность рекомбинантных антигенов оценивали электрофорезом и иммуноблоттингом. При оценке иммуногенности рекомбинантных белков их сорбировали на гидроокиси алюминия и использовали для внутрибрюшинной иммунизации мышей с последующим внутрибрюшинным введением живой вирулентной культуры или экзотоксина А. **Результаты.** Полученные рекомбинантные белки наружной мембраны OprF, OprL и OprI, а также делеционный вариант экзотоксина А (анатоксин) стимулировали иммунные реакции и защищали экспериментальных животных от вирулентной культуры *P. aeruginosa*. При использовании комплексов рекомбинантных белков, а также при иммунизации слитыми белками, состоящими из последовательностей двух или трех рекомбинантных антигенов, наблюдалось аддитивное увеличение защитных эффектов. Наиболее эффективными оказались комбинация рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина (индекс эффективности защитных свойств (ИЭ 3,0) и два слитых рекомбинантных белка (ИЭ 3,5). Первый слитый рекомбинантный белок (OprF-aTox-OprI) состоял из слитых полипептидных последовательностей OprF, анатоксина и OprI, а второй — из слитых полипептидных последовательностей OprF и OprI. **Заключение.** Полученные данные показали принципиальную

возможность использования слитых рекомбинантных белков OprF-aTox-OprI и OprF-OprI, а также комплекса рекомбинантных OprF и анатоксина в качестве кандидатов антисинегнойных вакцин.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 74—80

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белки наружной мембраны, OprF, OprL, OprI, экзотоксин А, анатоксин

N.A.Mihailova, E.M.Zimina, A.V.Soldatenkova, A.A.Kaloshin

DEVELOPMENT OF THE VACCINE BASED ON THE RECOMBINANT ANTIGENS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. The aim is obtaining, investigation and selection of recombinant antigens for inclusion theirs into the against *Pseudomonas* vaccine. **Materials and methods.** The genes encoding of the outer membrane proteins F, L and I and Exotoxin A were synthesized by PCR with the genomic DNA of *Pseudomonas aeruginosa*. The amplified sequences were cloned into plasmid vectors for expression in cells of *Escherichia coli*. As the result of expression were the synthesized recombinant proteins that were purified in columns with a nickel-activated sorbent. The authenticity of the recombinant antigens was assessed by electrophoresis and immunoblotting. For assessing the immunogenicity of the recombinant proteins, they were sorbed on aluminum hydroxide and used for intraperitoneal immunization of mice. After a course of immunization, mice were injected intraperitoneally with a live virulent culture or exotoxin A. **Results.** The obtained recombinant outer membrane proteins OprF, OprL and OprI, as well as the deletion variant of exotoxin A (toxoid) stimulated immune reactions and protected the experimental animals from the virulent culture of *P. aeruginosa*. Using of the complexes of the recombinant proteins, as well as immunization with the fusion proteins consisting from sequences of two or three recombinant antigens, produced an additive increase in protective effects. The combination of the recombinant OprF protein and the recombinant toxoid (efficiency index of protective properties (EI 3.0) and two recombinant fusion proteins (EI 3.5) were the most effective. The first recombinant fusion protein (OprF-aTox-OprI) consisted from fused polypeptide sequences of OprF, toxoid and OprI. The second recombinant fusion protein (OprF-OprI) consisted from fused polypeptide sequences of OprF and OprI. **Conclusion.** The data obtained showed the fundamental possibility of using recombinant fusion proteins OprF-aTox-OprI and OprF-OprI as well as the complex of the recombinant OprF protein and the recombinant toxoid as the candidated vaccines against *Pseudomonas aeruginosa*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019 No. 1, P. 74—80

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane proteins, OprF, OprL, OprI, exotoxin A, toxoid

ВВЕДЕНИЕ

Синегнойные инфекции широко распространены в стационарах различного профиля. Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) стабильно занимает второе-третье место среди возбудителей оппортунистических инфекций, предпосылками для развития которых являются ослабление иммунной системы больного и высокая резистентность патогена к широкому кругу химиотерапевтических средств, применяемых в клиниках [2, 8]. Этими обстоятельствами объясняется низкая эффективность антибиотиков третьего и четвертого поколения, а также высокая летальность при синегнойных осложнениях. Одним из путей решения этой проблемы может явиться создание специфических иммунобиологических средств, в частности, вакцин [1, 9].

Разработки антисинегнойных вакцин активно проводились с 70-х годов XX века. В первую очередь, рассматривалась перспектива препаратов на основе цельных инактивированных клеток. В качестве примера можно привести советскую вакцину, содержащую семь штаммов, представителей основных имунотипов *P. aeruginosa*, циркулирующих в стационарах [7]. Однако, эти препараты не были внедрены в практику здравоохранения из-за высокой токсичности. Поэтому были созданы вакцины

на основе разрушенных микробных клеток [6, 12], которые, несмотря на высокую иммуногенность, проявляли реактогенность, связанную с примесью липополисахарида клеточной стенки бактерии. Обнадешивающие результаты были получены при исследовании препаратов на основе очищенных белков наружной мембраны (outer membrane protein — Opr) с молекулярной массой в пределах от 10 до 100 кДа, которые обладали выраженным протективными свойствами и низкой токсичностью [3, 10, 12]. Значимыми, на наш взгляд, являются исследования по созданию препаратов анатоксина *P. aeruginosa* — химически детоксицированного экзотоксина А, одного из основных факторов патогенности синегнойной палочки [9]. Анатоксин использовали в клинике с целью получения донорской плазмы, которая оказалась высокоэффективной при лечении генерализованных форм заболеваний, вызываемых *P. aeruginosa* [4, 5].

Следует подчеркнуть, что сложности в создании эффективных вакцин, предназначенных для профилактики синегнойной инфекции, связаны с наличием многочисленных факторов патогенности у возбудителя, среди которых выделить наиболее значимые для формирования специфического иммунитета представляется сложной задачей. Содержание белковых антигенов в бактериальной клетке достаточно мало, процесс их очистки сложен, а в случае получения анатоксина остается вероятность реверсии токсичности. Поэтому использование традиционных трудоемких технологий представляется мало приемлемым. Выходом из данной ситуации может явиться использование генно-инженерных технологий, позволяющих получать рекомбинантные белки. Соответственно, целью проведенных исследований явилось получение и отбор рекомбинантных антигенов, способных стимулировать иммунные реакции и защищать экспериментальных животных от вирулентной культуры *P. aeruginosa*. В качестве кандидатных компонентов разрабатываемой вакцины выбраны антигены — наиболее изученные поверхностные белки OprF, OprL и OprI, а также экзотоксин А. На основе полученных продуктов предполагалось создать кандидатную синегнойную вакцину и изучить ее свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Последовательности целевых генов амплифицировали с помощью ПЦР, используя специфические праймеры, подобранные на основе полноразмерной последовательности штамма *P. aeruginosa* PA-01, представленной в базе данных GenBank [13]. В качестве матрицы использовали геномную ДНК, выделенную из штамма *P. aeruginosa* PA-103.

Амплифицированные последовательности встраивали в плазмидные векторы, несущие регуляторные участки для экспрессии в клетках *Escherichia coli*, используя рестриктазы, сайты которых были введены в концевые области праймеров для ПЦР. При встраивании использовали плазмиды pQE-30 (QIAGEN) и pET-28b(+) (Novagen). В первом случае рекомбинантными конструкциями трансформировали клетки *E. coli* штамма M15 (QIAGEN), а во втором случае — клетки штамма BL21(DE3). Первичный отбор клонов проводили с использованием рестриктового анализа. Окончательно отбор проводился секвенированием по Сэнгеру.

Синтез рекомбинантных белков с использованием созданных продуцентов проводили путем индукции экспрессии с помощью изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом. Белковые продукты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли [11].

Очистку рекомбинантных белков осуществляли методом хелатной хроматографии с использованием Ni-сефарозы (Amersham) в 8 М буферном растворе мочевины. Для перевода белков в нативное состояние использовали диализ против 50 мМ раствора Tris-HCl (pH 9,0). Содержание белков определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. При расчете концентрации рекомбинантных белков использовали коэффициенты экстинкции, рассчитанные в программе OMIGA.

Подлинность рекомбинантных белков подтверждали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Лэммли и имму-

ноблоттинга, проводимых в соответствии с общепринятыми методиками [11]. При иммуноблоттинге использовали кроличьи сыворотки крови против цельноклеточной культуры *P. aeruginosa*.

Рекомбинантные белки для иммунизации животных разводили в фосфатно-солевом буфере с добавлением гидроокиси алюминия из расчета 3 мг $Al(OH)_3$ на 1 мг белка и проводили сорбцию в течение 12 часов при температуре 4°C. Препараты вводили мышам весом 16-18 г внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл двукратно с двухнедельным интервалом. Через две недели после курса иммунизации животным вводили культуру *P. aeruginosa* (штаммы PA-170015, PA-103), либо рекомбинантный экзотоксин А. ЛД₅₀ вычисляли по формуле Кербера в модификации Ашмарина — Воробьева: $LD_{50} = 10^{(lgA - lg2 \times (B_1/C_1 + B_2/C_2 + B_3/C_3 + B_4/C_4 + B_5/C_5 - 0,5))}$; где А — максимальная инфекционная доза в опыте, В — количество животных, павших в группе, С — первоначальное количество животных в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ПЦР синтезированы последовательности генов мембранных белков: *oprF* (размер 1053 н.п.), *oprL* (размер 507 н.п.), *oprI* (размер около 252 н.п.). Все последовательности были встроены в полилинкер плазмиды pQE-30. В результате экспрессии рекомбинантных генов синтезированы и очищены в колонках с никель-активированным сорбентом специфические рекомбинантные продукты. При анализе в полиакриламидном геле выявили рекомбинантные продукты со следующими примерными молекулярными массами: 40 кДа у *OprF* (расчетная масса 38,9 кДа), 20 кДа у *OprL* (расчетная масса 19,2 кДа) и 10 кДа у *OprI* (расчетная масса 10,1 кДа). Все рекомбинантные белки проявили высокую специфичность при взаимодействии с поликлональной иммунной кроличьей сывороткой к цельным клеткам *P. aeruginosa*.

Клонирование экзотоксиновой последовательности проводили, используя плазмидный вектор pET-28b(+). В первую очередь, была получена конструкция с полноразмерным геном *toxA* (2 kb), продукт экспрессии которого (экзотоксин А) оказался высокотоксичным для мышей. Далее с помощью специфических рестриктаз (*HindIII* и *XhoI*), вырезали из гена *toxA* фрагмент размером 1598 н.п., встроили его в плазмиду pET-28b(+). Синтезированные и очищенные рекомбинантные экзотоксин А (73,8 кДа) и анатоксин (65,8 кДа) оказались специфичными в иммуноблоттинге при реакции с кроличьей сывороткой против синегнойного анатоксина.

На первом этапе при исследовании защитных свойств мембранных белков использовали живую вирулентную нетоксигенную культуру *P. aeruginosa* штамма PA-170015, а при исследовании анатоксина — полученный рекомбинантный экзотоксин А *P. aeruginosa*. Иммунизацию мышей осуществляли, используя дозы рекомбинантных белков с двукратным шагом от 6,25 до 50 мкг. Данные учета павших в течение недели животных свидетельствовали о способности препаратов защищать мышей от синегнойной инфекции. При заражении бактериальной культурой животным контрольных групп (интактные мыши той же партии) вводили от 25 до 400 микробных клеток (м.к.), а иммунизированным мышам от 50 до 800 млн м.к. Индексы эффективности (ИЭ) защитных свойств (отношение ЛД₅₀ для иммунизированных мышей к ЛД₅₀ в контрольной группе) рекомбинантного белка *OprF* составляли от 1,6 до 3,3. Оптимальная иммунизирующая доза соответствовала 25 мкг препарата. Для рекомбинантного белка *OprL* оптимальной иммунизирующей дозе также соответствовало 25 мкг белка с ИЭ равным 3,0. При оценке защитных свойств *OprI*, иммунизацию проводили с использованием доз 50 и 25 мкг и эффективной оказалась только доза 50 мкг со значением ИЭ 2,0 (табл. 1).

Мыши, иммунизированные анатоксином, проявили высокую выживаемость после введения полноразмерного рекомбинантного экзотоксина А. Рекомбинантный экзотоксин А вводили иммунизированным животным в дозах от 6,25 до 100 мкг на особь, а в контрольной группе — от 1,56 до 25 мкг. Оптимальная иммунизирующая доза для рекомбинантного анатоксина соответствовала 50 мкг белка на особь с индексом эффективности 8,9 (табл. 1).

Таблица 1. Защитные свойства рекомбинантных белков наружной мембраны от культуры *P. aeruginosa* штамма PA-170015

Вводимые препараты	Доза, мкг	ЛД ₅₀ , млн м.к. <i>P. aeruginosa</i> или мкг экз. А		ИЭ
		В опытных группах	В контрольных группах	
OprF	50	162,5	66	2,5
	25	214,4		3,3
	12,5	141,4		2,1
	6,25	107,2		1,6
OprL	50	206	73	2,8
	25	222		3
	12,5	187		2,6
	6,25	148		2
OprI	50	141,7	70,7	2,0
	25	114,9		1,6
Анатоксин	50	55,0	6,2	8,9
	25	31,6		5,1
	12,5	13,6		2,2
	6,25	9,3		1,5

OprF-OprI, 103,6 кДа для OprF-aTox и 107,2 кДа для OprF-aTox-OprI. При анализе в иммуноблоттинге слитые белки оказались специфичными при взаимодействии с сыворотками, иммунными к отдельным рекомбинантным белкам: OprF-OprI реагировал с сыворотками к OprF и OprI; OprF-aTox — с сыворотками к OprF и анатоксину; OprF-aTox-OprI — со всеми тремя сыворотками.

При исследовании защитных свойств слитых рекомбинантных белков и комплексов отдельных рекомбинантных белков в качестве материала для экспериментального заражения использовали культуру *P. aeruginosa* штамма PA-103, который характеризуется всеми основными факторами патогенности. Иммунизированным мышам вводили от 12,5 до 100 млн м.к., а группе контрольных неиммунизированных животных той же партии — от 6,25 до 50 млн м.к. живой вирулентной культуры *P. aeruginosa*. Наиболее эффективными оказались препараты OprF-aTox-OprI и OprF-OprI, с оптимальными дозами иммунизации в 50 мкг для первого слитого белка и 25 мкг — для второго.

При эксперименте по исследованию комплексов рекомбинантных белков изучили следующие смеси: OprF + OprL, OprF + анатоксин и OprF + OprL + анатоксин. Помимо группы интактных животных присутствовали еще три контрольные группы животных, которых иммунизировали рекомбинантными белками по отдельности. Рекомбинантные белки вводили с использованием оптимальных доз, подобранных на первом этапе исследований: OprF и OprL вводили в дозе 25 мкг, а анатоксин в дозе 50 мкг. Из результатов эксперимента видно, что все рекомбинантные белки в результате иммунизации в два раза увеличивали выживаемость мышей, инфицированных *P. aeruginosa* штамма PA-103. Тот же самый результат наблюдали при введении смеси двух мембранных белков (OprF + OprL). В то же время, использование смесей OprF + анатоксин и OprF + OprL + анатоксин приводило к аддитивному защитному эффекту с индексом эффективности 3,0 (табл. 2).

В результате проведенных исследований получены штаммы-продуценты ряда рекомбинантных белков наружной мембраны и анатоксина *P. aeruginosa*. Отработана технология очистки белков (OprF, OprL, OprI, анатоксин) и изучены их иммуногенные свойства. После иммунизации животных выявлены наиболее выраженные протективные свойства от синегнойной инфекции у рекомбинантных белков OprF, OprL и анатоксина. Рекомбинантный белок OprI обладал низкой иммуногенностью даже при введении увеличенной дозы что, вероятно, связано с его малым молекулярным весом. С целью исключения возможного влияния токсических факторов патогенности возбудителя в экспериментах с мембранными белками использован штамм PA-170015, характеризующийся отсутствием синтеза экзотоксина. При исследовании протектив-

Далее представляло интерес исследовать комплексное взаимодействие наиболее эффективных антигенов, что можно было достигнуть двумя путями: использованием комплексов отдельных белков или созданием слитых белков.

При создании слитого белка OprF-OprI последовательность гена oprI, кодирующую 192-342 аминокислотные остатки OprI, встроили в рекомбинантную плазмиду, несущую экспрессирующий ген oprF. При создании слитого белка OprF-aTox последовательность гена oprF встроили в рекомбинантную плазмиду для экспрессии рекомбинантного анатоксина. Далее с целью получения слитого белка OprF-aTox-OprI во вторую рекомбинантную конструкцию встроили последовательность гена oprI.

По результатам электрофореза в полиакриламидном геле выявлено, что полученные рекомбинантные белки соответствовали расчетным данным: 46,8 кДа для

ных свойств анатоксина использовали рекомбинантный экзотоксин А или штамм РА-103 *P. aeruginosa*, обладающий высокой токсичностью.

Ключевая цель при разработке рекомбинантной антисинегнойной вакцины заключается в создании препарата, который должен, с одной стороны, вызывать иммунные реакции против поверхностных антигенов возбудителя, а с другой стороны, способствовать нейтрализации одного из самых серьезных факторов патогенности — экзотоксина А. Данную задачу можно решить двумя путями: использованием комплекса отдельных белков или получением слитых вариантов, используя для заражения культуру *P. aeruginosa* штамма РА-103.

При комплексном использовании рекомбинантных белков OprF и анатоксина выявлен аддитивный эффект. Включение в состав смеси компонента OprL не приводило к усилению защитных свойств.

Полученные слитные варианты рекомбинантных белков (OprF-OprI, OprF-aTox, OprF-aTox-OprI) также обладали более высокими иммуногенными свойствами по сравнению с отдельными рекомбинантными белками. Среди слитых вариантов наиболее выраженным защитным эффектом обладали OprF-OprI и OprF-aTox-OprI. Таким образом, можно сделать вывод, что комплекс двух рекомбинантных белков (OprF и анатоксина) и слитые рекомбинантные белки могут быть использованы при создании антисинегнойной вакцины.

Кандидатная вакцина, полученная на основе комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина, сорбированных на геле гидроокиси алюминия, в настоящее время проходит доклинические испытания.

Таблица 2. Защитные свойства рекомбинантных белков от культуры *P. aeruginosa* штамма РА-103

Вводимые препараты в дозе, мкг	ЛД ₅₀ , млн м.к. <i>P. aeruginosa</i>		ИЭ
	В опытных группах	В контрольных группах млн. м.к.	
OprF-aTox, 50	40,6	15,4	2,6
OprF-aTox, 100	31,0		2,0
OprF-aTox-OprI, 50	53,6		3,5
OprF-aTox-OprI, 100	35,4		2,3
OprF-OprI, 50	50,0		3,3
OprF-OprI, 25	53,6		3,5
Анатоксин, 50	61,6	20,3	3,0
OprF, 25			
OprL, 25			
Анатоксин, 50	46,7		2,3
OprL, 25			
Анатоксин, 50	61,6		3,0
OprF, 25			
OprF, 25	43,5		2,1
OprL, 25			
OprF, 25	40,6		2,0
OprL, 25	43,6		2,2
Анатоксин, 50	37,0		1,9

ЛИТЕРАТУРА

1. Благовидов Д.А., Костинов М.П., Симонова О.И. и др. Переносимость вакцины против *P. aeruginosa* у детей с муковисцидозом и врожденными пороками развития легких. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 2 (87):55-66.
2. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А. и др. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015, 17(3):170-186.
3. Макаренко Т.А., Станиславский Е.С. Иммунологическое изучение белков клеточной стенки *Pseudomonas aeruginosa*. Журнал микробиол. 1996, 2: 7-9.
4. Михайлова Н.А., Шаймухаметов Ф.А., Кузнецова Т.Н., Мороз А.Ф. Пат. 1481962 С СССР А61К35/74. Способ обезвреживания очищенного экзотоксина А синегнойной палочки. Заявл. 15.07.87; опубл. 09.06.95.
5. Подгорная Л.Г., Дзюбан Н.Ф. Антигенные свойства анатоксина синегнойной палочки и протективное действие антитоксической противосинегнойной сыворотки. Журнал микробиол. 1986, 6:67-69.
6. Станиславский Е.С., Жоо И., Северцева М.К. и др. Иммунологическая эффективность и безвредность в эксперименте пиоиммуногена-вакцины против инфекции *Pseudomonas aeruginosa*. Журнал микробиол. 1982, 5:70-75.
7. Титова Т.И., Сидорова Т.Н., Радкевич С.А. и др. Получение и изучение свойств поливалентной корпускулярной синегнойной вакцины. Журнал микробиол. 1985, 8:80-8.
8. Chatterjee M., Anju C.P., Biswas L. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. Int. J. Med. Microbiol., 2016, 306(1):48-58.

9. Doring G., Pier G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*. 2008, 26(8):1011-1024.
10. Lee N.G., Jung S.B., Ahn B.Y. et al. Immunization of burn-patients with a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy. *Vaccine*. 2000, 18:1952-1961.
11. Sambrook J.F., Russell D.W. *Molecular Cloning*, 2001.
12. Stanislavsky E.S., Joo I., Mashilova G.M. et al. Vaccines against *Pseudomonas aeruginosa* infection: 1. Experimental studies. *Vaccine*. 1985, Jun 3(2):128-36.
13. Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, complete genome. GenBank, Accession Number AE004091.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

М.И.Михайлов¹, Е.Ю.Малинникова¹, К.К.Кюрегян¹, И.А.Потемкин¹, Н.Д.Алсалих², О.В.Исаева¹,
А.А.Карлсен¹, В.С.Кичатова¹, А.Д.Поляков³

ПАРАДОКС БАЛАЯНА

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²Российский университет дружбы народов, Москва; ³Управление Роспотребнадзора по Белгородской области

В статье представлены результаты изучения эпидемиологии гепатита Е на территории Российской Федерации. Получены данные, объясняющие феномен, известный как парадокс Балаяна — широкое распространение анамнестических тел к вирусу гепатита Е при отсутствии регистрируемой заболеваемости. Показано, что завозные случаи инфекции не в состоянии поддерживать эпидемиологический процесс гепатита Е на территории России. Большинство случаев ВГЕ-инфекции имеют автохтонный характер и связаны с зоонозной передачей вируса 3 генотипа от свиней.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 80—85

Ключевые слова: гепатит Е, вирус гепатита Е, антитела, пути передачи, зооноз

M.I.Mikhailov¹, E.Yu.Malinnikova¹, K.K.Kyuregyan¹, I.A.Potemkin¹, N.D.Alsalikh², O.V.Isaeva¹,
A.A.Karlsen¹, V.S.Kichatova¹, A.D.Polyakov³

BALAYAN PARADOX

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian University of People Friendship, Moscow; Administration of the Rospotrebnadzor of Belgorod region

This article presents the results of a study of the epidemiology of hepatitis E in the Russian Federation. Obtained data explaining the phenomenon, known as the Balayan paradox — the wide distribution of anamnestic antibodies to the hepatitis E virus in the absence of a registered incidence. It was shown that imported cases of infection are not able to support the epidemiological process of hepatitis E in Russia. The most cases of HEV infection are autochthonous in nature and are associated with zoonotic transmission of genotype 3 virus from pigs.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 80—85

Key words: hepatitis E, hepatitis E virus, antibodies, transmission, zoonosis

ВВЕДЕНИЕ

Столетний юбилей Института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова послужил поводом к подведению итогов и разработке новых направлений дальнейших исследований. Лаборатория вирусных гепатитов — одна из самых молодых в институте. Она была организована всего два с половиной года тому назад сотрудниками, перешедшими из Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, из лаборатории, которую ранее возглавлял академик РАМН М.С. Балаян, первооткрыватель вируса гепатита Е (ВГЕ) [9]. Это определило основное направление ис-

следований лаборатории — изучение вирусных гепатитов с энтеральным механизмом передачи, гепатитов А (ГА) и Е (ГЕ).

Открытие ВГЕ в результате опыта по самозаражению, который провел М.С. Балаян, а также описание крупных вспышек в Юго-восточной Азии привлекли пристальное внимание к этой инфекции. По оценке ВОЗ, в настоящее время ВГЕ ежегодно вызывает около 3 млн случаев острой, клинически выраженной инфекции, из которых около 44 тысяч заканчивается летально [11]. Высокая спорадическая и вспышечная заболеваемость ГЕ в странах с жарким климатом, значительная летальность среди беременных женщин определили значимость гепатита Е прежде всего как региональной инфекции. Ситуация изменилась, когда появились данные о частоте обнаружения антител к ВГЕ (анти-ВГЕ) среди здорового населения неэндемичных по ГЕ регионов мира. Кроме того, обнаружение случаев хронического гепатита Е у лиц с ослабленным иммунитетом и выявление поражения нервной системы, связанного с непосредственным действием ВГЕ, повысило интерес к инфекции как общемировой проблеме здравоохранения.

М.С. Балаян обратил внимание на следующее явление, характерное для ГЕ в странах с умеренным климатом — значительный процент выявления анти-ВГЕ, свидетельствующих о встрече с вирусом здорового населения, при практически полном отсутствии регистрируемых случаев ГЕ. Это положение было определено как парадокс Балаяна.

Цель работы — представить полученные нами данные, необходимые для объяснения парадокса Балаяна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе проведения исследований проведено тестирование сывороток крови, собранных от условно здорового населения, проживающего в различных регионах страны: 6 регионов РФ (n=6238) — Московской, Ростовской, Свердловской областей, Хабаровского края, Республики Саха (Якутия) и Республики Тыва. В исследовании были представлены все возрастные группы — менее 1 года, 1-4 года, 5-9 лет, 10-14 лет, 15-19 лет, 20-29 лет, 30-39 лет, 40-49 лет, 50-59 лет и старше 60 лет, каждая возрастная группа включала примерно 100 человек в каждом регионе. Кроме того, исследованы следующие группы: условно здоровое взрослое население Белгородской области (n=2482 человека); трудовые мигранты, недавно прибывшие в РФ из Узбекистана (n=464), Таджикистана (n=415), Украины (n=308) и Молдовы (n=146) и проходившие обследование в Центре гигиены и эпидемиологии Московской области. Кроме того, исследованы сыворотки крови от 181 больного острым гепатитом Е, проживающего в Московской, Владимирской, Белгородской области и г. Санкт-Петербург.

От всех участников исследования были получены информированное согласие и анкеты, отражающие демографические данные и сведения о перенесенных заболеваниях печени, а также факторах риска инфицирования энтеральными и парентеральными гепатитами.

Во всех образцах сыворотки крови определяли анти-ВГЕ IgG и IgM методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов НПО «Диагностические системы» («ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M») согласно инструкции производителя. РНК ВГЕ определяли в образцах, положительных по анти-ВГЕ IgM, методом ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами к участку генома ВГЕ, кодирующему капсидный белок. На наличие РНК ВГЕ тестировали свиные фекалии от 1389 животных в возрастном интервале от 0 до 12 месяцев, собранные на 17 свинофермах во Владимирской, Свердловской, Саратовской, Калининградской, Архангельской областях и Хабаровском крае.

Определение нуклеотидной последовательности ВГЕ проводили методом прямого секвенирования ампликонов. Продукты ПЦР, соответствующие фрагменту-мишени, выделяли из агарозы с помощью набора QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN). Для определения последовательности фрагментов использовали автоматический секвенатор CEQ8800 (Beckman Coulter). Секвенирование осуществляли с использованием набора GenomeLab™Methods Development Kit Dye Terminator Cycle

Sequencing ("Beckman Coulter", США), основанного на использовании флуоресцентных меток, связанных с ddNTP (DyeTerminators), согласно протоколу производителя.

Секвенирование каждого ПЦР-фрагмента проводили в двух направлениях — с прямым и обратным праймером. Полученные хроматограммы были собраны в готовые последовательности при помощи модуля Seqman 4.03 (пакет программ LASERGENE, DNASTAR, США). Выравнивание и филогенетический анализ последовательностей ВГЕ проводили с помощью программы Mega 5.0.

Анализ заболеваемости ГЕ проводили по материалам официальных статистических данных об инфекционной заболеваемости в Российской Федерации (форма №1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»), публикуемых Роспотребнадзором.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы EXCEL 2003 и программы статистической обработки данных GraphPad Prism 4. Для оценки достоверности различий значений показателей в сравниваемых группах с использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% ($p < 0,05$)).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

О наличии перенесенной ВГЕ-инфекции свидетельствуют анти-ВГЕ IgG, которые, в отличие гепатита А, циркулируют менее продолжительное время [2]. Сведения о частоте выявления маркеров инфицирования ВГЕ в России до начала наших исследований носили ограниченный характер, поскольку исследователи ограничивались определением анти-ВГЕ в отдельных группах населения нескольких регионов страны [1,3]. В связи с этим, для изучения интенсивности циркуляции ВГЕ в РФ необходимо определить частоту выявления анти-ВГЕ в представительных выборках условно здорового населения географически удаленных друг от друга регионов. Для решения данной задачи проводили определение анти-ВГЕ IgG среди условно здорового населения 6 регионов РФ — Московской, Ростовской, Свердловской областей, Хабаровского края, Республики Саха (Якутия) и Республики Тыва.

Общая частота выявления анти-ВГЕ IgG среди обследованного условно здорового населения РФ составила 4,1% (258/6292). Наиболее часто анти-ВГЕ выявляли среди населения Московской области (7,5%), этот показатель достоверно превышал частоту выявления анти-ВГЕ в трех регионах — Свердловской области, Республике Саха (Якутия) и Хабаровском крае (2,6; 2,1 и 2,2%, соответственно, $p < 0,05$, критерий Фишера).

При тестировании 2482 человек, проживающих в Белгородской области, анти-ВГЕ IgG обнаружены в 13,42 % случаев, что также свидетельствовало о довольно интенсивной циркуляции вируса среди населения этого региона России.

Анализ частоты выявления анти-ВГЕ IgG в разных возрастных группах условно здорового населения продемонстрировал резкое увеличение этого показателя среди лиц старше 60 лет, при этом такая закономерность была отмечена во всех 6 обследованных регионах. В двух регионах — Московской и Ростовской областях, частота выявления анти-ВГЕ IgG была более 25% среди лиц старше 60 лет, достоверно превышая аналогичные показатели в остальных четырех регионах ($p < 0,05$), при этом в других возрастных группах — до 19 лет и 20-59 лет, статистически значимые различия по частоте выявления анти-ВГЕ во всех шести регионах отсутствовали.

Во всех изученных регионах частота выявления анти-ВГЕ IgG у лиц старше 60 лет в несколько раз превышает показатели, наблюдаемые в более молодых возрастных группах. Однако, несмотря на различия между регионами в показателях частоты выявления анти-ВГЕ, тенденция к значительному росту доли анти-ВГЕ положительных лиц в группе старше 60 лет была абсолютно одинаковой.

В процессе выполнения исследования острый гепатит Е был диагностирован у 181 больного, проживающего в Московской, Владимирской, Белгородской области и г. Санкт-Петербурге [5]. Анализ нуклеотидных последовательностей ВГЕ, выделенных от пациентов, установил их принадлежность к 3 генотипу. Наиболее часто

ГЕ болели городские жители. Среди них преобладали мужчины в возрастных группах 50-59 и 60-69 лет. Об автохтонном характере заболевания свидетельствует то, что большинство пациентов до заболевания не выезжали за пределы региона проживания и не имели контактов с больными из других регионов.

В Российской Федерации в официальную статистическую форму регистрации (форма №1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях») острый гепатит Е (ОГЕ) введен с 2013 года. В стране происходит постепенный рост регистрируемых случаев заболевания. В 2017 году ОГЕ был зарегистрирован в 25 регионах страны. Всего заболели 158 человек, что составило 0,11 на 100 тыс. Из заболевших 13 были дети в возрасте до 14 лет. Максимальные показатели заболеваемости зарегистрированы в Ивановской (27 заболевших/2,61 на 100 тыс. чел.), Владимирской (11 заб./0,78), Воронежской (20 заб./0,86) и Кировской областях (17 заб./1,31).

Полученные результаты свидетельствуют об относительно высокой частоте выявления анти-ВГЕ IgG среди условно здорового населения во всех обследованных регионах при низкой регистрации случаев острого гепатита Е. Анализ литературы свидетельствует, что подобная ситуация характерна не только для РФ, но и других стран с умеренным климатом [10]. Таким образом, данные сероэпидемиологических исследований подтверждают сохранение актуальности положений парадокса Бааяна.

Одним из важных вопросов, возникшим при изучении эпидемиологии ГЕ, является вопрос об источниках ВГЕ. Длительное время считалось, что передача вируса от человека к человеку протекает крайне редко. Особенно это положение применимо в отношении 3 и 4 генотипа ВГЕ. Групповые вспышки инфекции в регионах с умеренным климатом встречаются крайне редко. В течении всего времени изучения этой инфекции нами лишь однажды была зарегистрирована вспышка ГЕ (Ковров, 2010 г [6]). Кроме того, мы крайне редко регистрировали семейные очаги ОГЕ.

Первоначально объяснением возникновения заболеваний ГЕ на эндемичных территориях служил возможный завоз вируса лицами, заразившимися в южных регионах мира. Подтверждением такой возможности послужили данные, полученные совместно с Е.В. Эсауленко [8]. В конце декабря 2011 г. и в январе 2012 г. в клинические стационары Санкт-Петербурга поступили пациенты, прибывшие на учебу из Индии (г. Мумбай) в составе группы, превышающей 200 человек. У 13 из них был поставлен диагноз «острый гепатит Е». Эта группа пациентов из Мумбая длительное время находилась у себя на родине в очаге инфекции, в результате чего в г. Санкт-Петербург прибыли лица, имевшие ГЕ на разных этапах инфекционного процесса. При дальнейшем наблюдении за очагом случаи передачи ВГЕ контактным лицам установлены не были.

Несмотря на интенсивное развитие туризма, число прибывающих лиц, инфицированных ВГЕ, не столь велико. В отличие от туристов, поток мигрантов, приезжающих в Россию из ближнего зарубежья, значителен. По данным Федеральной миграционной службы в настоящее время в России находятся свыше 10 миллионов иностранных граждан, из них граждан стран СНГ — около 8,7 миллиона человек.

Образцы сывороток крови, собранных от мигрантов, подвергли скринингу на присутствие антител к ВГЕ IgM и IgG. В среднем, 5,93% (79/1333) мигрантов были серопозитивными по анти-ВГЕ IgM, 25,36% (338/1333) были положительными по анти-ВГЕ IgG, и 3% (40/1333) имели одновременно анти-ВГЕ IgM и IgG. Анти-ВГЕ IgG достоверно чаще выявляли среди мигрантов из Узбекистана и Таджикистана, по сравнению с мигрантами из Украины и Молдовы: 25,4% и 43,1%, соответственно, по сравнению с 7,8% и 12,3%, соответственно ($p < 0,01$). Наличие анти-ВГЕ IgM, указывающее на текущую или недавнюю инфекцию, было установлено среди мигрантов из Узбекистана, Таджикистана, Украины и Молдовы с частотой 3,9%, 7,8%, 5,8% и 6,8%, соответственно. РНК ВГЕ не была обнаружена ни в одном из 79 образцов сыворотки крови, содержащем IgM или IgG. Исходя из полученных данных можно сделать заключение о том, что данная группа лиц потенциально может быть источником вируса, но реально не в состоянии поддержать эпидемиологический процесс ГЕ на территории России.

Открытие зоонозной природы ГЕ позволяет объяснить глобальную циркуляцию ВГЕ на территории страны. По общему мнению, несмотря на обнаружение ВГЕ у различных животных (свиньи, куры, олени, крысы, кролики и т.д.), основным резервуаром вируса служат свиньи. Тесный контакт человека со свиньями, употребление в пищу контаминированной ВГЕ свинины определяют ведущее место в распространении вируса в популяции людей. Подтверждением широкого распространения ВГЕ среди популяции свиней служат данные, полученные нами (работа выполнена совместно с С.А. Солониным). Были собраны фекалии от свиней в возрастном интервале 2-4 месяца в 6 географически отдаленных (более 1000 км) друг от друга регионах РФ — Владимирской, Свердловской, Саратовской, Калининградской, Архангельской областях и Хабаровском крае. Всего было обследовано 17 свиноферм, собрано 1389 образцов. Из 17 обследованных свиноферм только на 3 не было выявлено ни одного случая ВГЕ-инфекции у животных в возрасте 2-4 месяцев — на одной ферме в Хабаровском крае и двух фермах в Калининградской области. Результаты определения частоты выявления ВГЕ-инфекции у свиней в возрасте 2 — 4 месяцев показали значительные варьирования от региона к региону, от 60,5% во Владимирской области до 8,8% в Хабаровском крае [4].

Анализ сходства нуклеотидных последовательностей в участке ОРС 2 РНК ВГЕ, а также построение филогенетических деревьев для данного участка генома ВГЕ с достоверным филогенетическим группированием с использованием бутстрэп-анализа позволили установить, что все изоляты принадлежали к 3 генотипу ВГЕ, аналогичному генотипу вируса, циркулирующего среди людей на территории России. Кроме того, было показано, что выделяемые от заболевших людей и от свиней на одной территории (Белгородская область) геноизоляты ВГЕ очень близки между собой, что свидетельствует о возможной передаче вируса от свиней человеку [7].

Хорошо известно, что своевременно и грамотно поставленный вопрос в процессе изучения той или иной инфекции может быть чрезвычайно важен. При объяснении парадокса Балаяна были получены данные, необходимые для понимания эпидемиологии ГЕ. Несомненно, эпидемиология ГЕ сложнее, чем мы представляем в настоящее время. Остается не выясненной до конца возможная роль других животных (помимо свиней) в распространении вируса. Нет всеобъемлющего представления о передаче ВГЕ со сточными водами, контаминированным мясом и другими сельскохозяйственными продуктами (например, через контаминированные ВГЕ корнеплоды). Также нуждается в изучении характер заноса и распространения вариантов ВГЕ, не свойственных для той или иной территории.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быстрова Т.Н., Полянина А.В., Княгина О.Н. Характеристика гепатит Е-инфекции на территории с умеренным климатом. Медицинский альманах. 2010, 2:236-239.
2. Кюрегян К.К., Потемкин И.А., Лопатухина М.А., Попова О.Е., Исаева О.В., Малинникова Е.Ю., Романенко В.В., Поляков А.Д., Михайлов М.И. Длительность сохранения анamnестических антител к вирусу гепатита Е. Клиническая лабораторная диагностика. 2018, 63(5): 310-314.
3. Кузьменко Е.В., Вахнина Л.Н. К вопросу о частоте обнаружения антител к вирусу гепатита Е у населения эндемичных регионов на примере Магаданской области. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2004, 5: 67-68.
4. Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов (монография). М., Икар, 2013.
5. Малинникова Е.Ю. Клинико-эпидемиологическая характеристика гепатита Е в Российской Федерации. Автореф. дисс. д-ра мед. наук. М., 2014.
6. Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Исаева О.Е., Гордейчук И.В., Солонин С.А., Зайцев О.В., Заботина Е.Е., Манина Т.А., Лисицина Е.В., Душина И.Ф., Штурмина С.М., Краснов В.П., Груздев К.Н., Брызгалов С.П., Лисичин Е.А. Групповая заболеваемость гепатитом Е в г. Коврове Владимирской области (предварительное сообщение). Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН. Медицинская вирусология. 2009, 26: 239.

7. Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К. Молекулярная эпидемиология и диагностика гепатита Е. Молекулярная диагностика 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2017, С. 68-69.
8. Эсауленко Е.В., Малинникова Е.Ю., Перадзе Х.Д., Яковлев А.А., Михайлов М.И. Спорадические и групповые завозные случаи гепатита Е в Санкт-Петербурге. Журн. микробиол. 2013, 1: 38-41.
9. Balayan M.S., Andjaparidze A.G., Savinskaya S.S. et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology. 1983, 20(1):23-31.
10. Capai L., Charrel R., Falchi A. Hepatitis E in High-Income Countries: What Do We Know? And What Are the Knowledge Gaps? Viruses. 2018 May 25;10(6). pii: E285. doi: 10.3390/v10060285.
11. WHO. Hepatitis E. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

М.Н.Носик¹, К.А.Рыжов¹, А.Б.Потапова²

ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ-1 СУБТИПА А6 В ПРИСУТСТВИИ ГОРМОНОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ СОВРЕМЕННЫХ ГОРМОНАЛЬНЫХ КОНТРАЦЕПТИВОВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, ²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Цель. Изучение влияния женских половых гормонов, входящих в состав контрацептивов, на репликацию ВИЧ-1 и эффективность действия антиретровирусных препаратов (АРТ-препараты). **Материалы и методы.** Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) доноров, стимулированные ФГА (2 мкг/мл), и лимфобластоидные клеточные линии MT-4 и Jurkat инфицировались ВИЧ-1 (субтип А6). Клетки культивировались в течение 6 дней в присутствии различных концентраций β-эстрадиола и прогестерона, без/или добавлением АРТ-препаратов ламивудина(ЗТС), этравирина(ЕТР) и индинавира(IDV). Мониторинг вирусной продукции осуществлялся путем количественного определения р24 в культуральной жидкости клеток на 6 день после инфицирования. Эксперименты ставились в 8 повторах. **Результаты.** Выявлено увеличение вирусной репликации в 1,3-1,8 раза в присутствии высоких концентраций обоих гормонов (26 мкг/мл, 136 мкг/мл). При культивировании инфицированных клеток одновременно в присутствии гормонов и АРТ-препаратов разного класса отмечено неполное подавление репродукции вируса. Средний показатель уровня подавления вирусной репликации для β-эстрадиола составил 77,3% и 69,8% для прогестерона. В отсутствии гормонов при добавлении АРТ-препаратов в той же самой концентрации (2,5 мкг/мл) наблюдалось полное подавление вирусной продукции. **Заключение.** Показано, что in vitro высокие концентрации стероидных гормонов усиливают репликацию ВИЧ-1 и, как следствие, снижают эффективность АРТ-препаратов. Учитывая это, женщинам, имеющим высокий риск инфицирования ВИЧ, целесообразно перед назначением гормональной контрацепции проводить мониторинг уровня гормонов, который меняется во время менструального цикла и беременности.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 85—90

Ключевые слова: ВИЧ-1 субтипа А6, женские половые гормоны, вирусная репликация, антиретровирусные препараты

М.Н.Nosik¹, К.А.Ryzhov¹, А.В.Potapova²

REPLICATION OF HIV-1 SUBTYPE A6 IN THE PRESENCE OF HORMONES INCLUDED IN THE MODERN HORMONAL CONTRACEPTIVES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, ²Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. To study how female hormones included in oral contraceptives (β-estradiol and progesteron) affect HIV-1 replication and efficacy of antiviral drugs. **Material and methods.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and cell lines MT-4, Jurkat were infected with HIV-1 (subtype A6). Afterwards the cells

were cultured for 6 days in the presence of β -estradiol/progesterone with or without the presence of antiretroviral drugs Lamivudin (3TC), Etravirin (ETR) and Indinavir (IDV), which are widely used for HIV treatment. Virus production was monitored by p24 levels in culture supernatants on day 6. The experiments were performed in eight repetitions. *Results.* There was a 1,3–1,8-fold increase of virus replication in the presence of high concentrations of both hormones (26, 136 $\mu\text{g/ml}$). Incomplete suppression of viral replication was observed when infected cells were co-cultivated in the presence of hormones (26 μg , 136 μg) and antiretroviral drugs. The mean suppression rate of viral replication for β -estradiol was 77.3% and 69.8% for progesterone. However, in the absence of hormones the virus production was completely suppressed by those drugs. *Conclusion.* The high concentrations of steroid hormones induce HIV-1 replication and as a result reduce the efficacy of antiretroviral drugs NVP and IDV in vitro. Thus it is advisable for women at high risk of HIV infection to monitor hormone levels that change during the menstrual cycle and pregnancy before prescribing hormonal contraception.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 85–90

Key words: HIV-1 subtype A6, female hormones, viral replication, antiretroviral drugs

ВВЕДЕНИЕ

В общемировом масштабе женщины и девочки по-прежнему остаются самой уязвимой группой по ВИЧ-инфекции. Из 36,7 миллионов людей, живущих с ВИЧ, 51% (18,8 миллионов) составляют женщины [UNAIDS, 2018]. Согласно ВОЗ, каждый день среди новых ВИЧ-инфицированных около 43% составляют женщины. При этом 19% ВИЧ-инфицированных женщин — это девушки в возрасте 15–24 лет [1, 2]. Заболевания, связанные с ВИЧ-инфекцией, остаются ведущей причиной смерти женщин репродуктивного возраста. Показатели сокращения смертности среди женщин по-прежнему остаются более высокими, чем у мужчин. Этот гендерный разрыв особенно заметен в Африке к югу от Сахары, где 56% людей, живущих с ВИЧ — это женщины. К сожалению, данная проблема также актуальна и для отечественного здравоохранения. В России в 2017 г. среди вновь выявленных ВИЧ-инфицированных доля женщин составила 40%, из которых 35,3% — это женщины репродуктивного возраста. Согласно эпидемиологическому исследованию, проведенному среди ВИЧ-положительных женщин, у 45,4% женщин беременность наступила после установления диагноза ВИЧ-инфекции [3]. По предварительным данным среди впервые выявленных в 2017 г. ВИЧ-позитивных лиц с установленными факторами риска, 0,8% составляли дети, инфицированные от матерей во время беременности, родов и при грудном вскармливании [Справка «ВИЧ-инфекция в РФ в 2017 г.»].

В заявлении ВОЗ говорится, что доступ к квалифицированной медицинской помощи, службам планирования семьи и доступ к полному спектру методов контрацепции имеют основополагающее значение для обеспечения прав и благополучия женщин и девочек. В связи с этим, ВОЗ настоятельно рекомендует использование методов гормональной контрацепции для женщин, имеющих высокий риск инфицирования ВИЧ, и женщин, живущих с ВИЧ, в том числе и тех, кто получает антиретровирусную терапию (АРТ). ВОЗ также подчеркивает, что добровольное применение комбинированной гормональной контрацепции женщинами, живущих с ВИЧ и желающими предотвратить нежелательную беременность, является важной стратегией для профилактики (сокращения) передачи ВИЧ-инфекции от матери к ребенку [13]. Однако в настоящее время имеющиеся данные, относительно того, влияет ли применение гормональной контрацепции на риск повышения инфицирования ВИЧ, по-прежнему остаются противоречивыми. Например, несколько исследований показало, что использование инъекционного контрацептива медроксипрогестерона ацетата может повышать риск инфицирования ВИЧ. Десятилетнее исследование, включающее 1498 женщин и проведенное среди работниц секс-индустрии Кении, выявило, что у женщин, которые использовали медроксипрогестерон ацетат или оральные контрацептивы, был повышенный риск инфицирования ВИЧ, по сравнению с женщинами, не применяющими гормональную контрацепцию [7]. Широкомасштабное исследование, проведенное среди жительниц 4 африканских

стран: Кении, Лесото, Малави и Зимбабве (4549 женщин), также показало, что у женщин, использующих медроксипрогестерон ацетат, отмечался повышенный риск инфицирования ВИЧ [8]. Напротив, другое исследование, проведенное в Уганде и Зимбабве (4439 женщин), не выявило повышенного риска инфицирования ВИЧ, связанного с использованием оральных или инъекционных контрацептивов [9]. Не было выявлено увеличения риска прогрессирования ВИЧ-инфекции среди ВИЧ-инфицированных женщин, использующих гормональную контрацепцию, и в результате исследования, проведенного в семи странах Восточной и Южной Африки с участием 2269 хронически инфицированных женщин [6].

Основываясь на имеющихся данных 1 июня 2015 г., ВОЗ выпустила 5 издание руководства «Рекомендации по использованию методов гормональной контрацепции у женщин, имеющих высокий риск инфицирования ВИЧ», включающее более 2000 рекомендаций относительно 25 различных методов контрацепции. В декабре 2016 г. в данные рекомендации были внесены некоторые уточнения. В рекомендациях указывается, что поскольку существующие исследования по изучению связи между применением гормональной контрацепции и инфицированием ВИЧ имеют важные методологические ограничения, затрудняющие их интерпретацию, невозможно дать однозначный ответ, увеличивают ли гормональные средства контрацепции риск инфицирования ВИЧ или нет [12]. В них подчеркивается, что в проведенных исследованиях не были учтены такие поведенческие характеристики женщин, как ее сексуальная активность, использование или неиспользование презервативов, наличие нескольких сексуальных партнеров, т.е. те факторы, которые могут также оказывать влияние на риск инфицирования ВИЧ. Поэтому женщинам, имеющим высокий риск ВИЧ-инфицирования, и женщинам с бессимптомным или умеренным клиническим течением заболевания ВИЧ (стадия 1 или 2 по классификации ВОЗ) рекомендуется применять без ограничения методы комбинированной гормональной контрацепции (комбинированные оральные контрацептивы, комбинированные контрацептивные пластыри, комбинированные контрацептивные вагинальные кольца), чисто прогестиновые таблетки, субдермальные контрацептивные импланты, содержащие левоноргестрел (ЛНГ) и этоноргестрел (ЭТГ). Женщинам, имеющим высокий риск ВИЧ-инфицирования, также рекомендуется использовать такие инъекционные средства, как медроксипрогестерон ацетат и норэтистерон энантат, поскольку преимущества данного метода контрацепции перевешивают возможное повышение риска инфицирования ВИЧ. При этом подчеркивается, что женщин, использующих инъекционный метод прогестиновой контрацепции и имеющих высокий риск ВИЧ-инфицирования, необходимо информировать о том, что есть вероятность того, что чисто прогестиновые инъекционные средства контрацепции могут повышать риск инфицирования ВИЧ. Поэтому им следует настоятельно рекомендовать всегда использовать мужские или женские презервативы, а также другие меры профилактики ВИЧ.

С учетом широкого применения гормональной контрацепции и противоречивых данных о ее влиянии на прогрессирование ВИЧ-инфекции нами было проведено изучение на модели клеточных культур, как женские гормоны, входящие в состав контрацептивов (β -эстрадиол и прогестерон), влияют на репликацию ВИЧ-1 и эффективность действия антиретровирусных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры: моноклеарные клетки периферической крови (МНК) доноров, стимулированные ФГА (2 мкг/мл); лимфобластоидные клеточные линии MT-4 и Jurkat. Инфицирование клеток: клетки инфицировались ВИЧ-1 субтипа А6, преобладающего на большей части территории Российской Федерации, и культивировались в течение 6 дней в присутствии различных концентраций β -эстрадиола и прогестерона, без/или с добавлением антиретровирусных препаратов ламивудина (ЗТС), этравирина (ЕТР) и индинавира (IDV). Мониторинг вирусной продукции осуществлялся путем количественного определения р24 в культуральной жидкости клеток, на 6 день после инфицирования. эксперименты ставились в 8 повторах.

Концентрации гормонов: 1,1 мкг/мл — 5,4 мкг/мл (низкие концентрации); 26 мкг/мл — 136 мкг/мл (высокие концентрации).

Схемы инфицирования клеток: клетки + гормон, контакт 30 мин + вирус; клетки + вирус, контакт 30 мин + гормон; одномоментное внесение вируса и гормона в клетки.

Антиретровирусные препараты: ламивудин (ЗТС) — 2,5 мкг/мл; этравирин (ЕТР) — 2,5 мкг/мл; индинавир (IDV) — 2,5 мкг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Низкие концентрации β -эстрадиола (1,1-5,4 мкг/мл) ингибировали репликацию вируса (p24: 1,8 и 3,8 нг/мл, соответственно; $p \leq 0,03$ и $p \leq 0,02$; контроль вируса (КВ): 9,0 нг/мл). Те же самые концентрации прогестерона незначительно снижали уровень вирусной продукции (p24: 6,7 и 8,0 нг/мл, соответственно; $p \leq 0,02$ и $p \leq 0,02$; КВ: 9,0 нг/мл). Однако наблюдалось увеличение вирусной репликации в присутствии более высоких концентраций β -эстрадиола и прогестерона. При концентрациях β -эстрадиола в количестве 26-136 мкг/мл уровень p24 составил 12 и 16,5 нг/мл, соответственно; $p \leq 0,02$ и $p \leq 0,02$; КВ: 9,0 нг/мл. При концентрациях прогестерона 26-136 мкг/мл, уровень p24 составил 11,7 и 16,0 нг/мл, соответственно; $p \leq 0,03$ и $p \leq 0,02$; КВ: 9,0 нг/мл.

При культивировании инфицированных МНК одновременно, в присутствии β -эстрадиола (26 мкг, 136 мкг) и препарата класса НИОТ ламивудина (ЗТС, 2,5 мкг/мл) было отмечено неполное подавление репликации вируса (p24: 0,7 нг/мл и 1,2 нг/мл, соответственно; $p \leq 0,02$ и $p \leq 0,01$; КВ: 9,0 нг/мл). Неполное подавление вирусной продукции наблюдалось и при культивировании инфицированных МНК одновременно, в присутствии прогестерона (26 мкг, 136 мкг) и ЗТС (2,5 мкг/мл): (p24: 1,7 нг/мл и 2,6 нг/мл, соответственно; $p \leq 0,02$ и $p \leq 0,02$; КВ: 9,0 нг/мл). Аналогичная картина наблюдалась при репликации вируса в присутствии гормонов и препарата класса НИОТ этравирина (ЕТР, (2,5 мкг/мл): β -эстрадиол (26 мкг, 136 мкг): p24: 0,9 нг/мл и 1,5 нг/мл, соответственно; $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,02$; КВ: 9,0 нг/мл); Прогестерон (26 мкг, 136 мкг): p24: 1,7 нг/мл и 2,6 нг/мл; $p \leq 0,02$ и $p \leq 0,02$; КВ: 9,0 нг/мл. Также неполное подавление репликации вируса отмечалось при культивировании инфицированных МНК в присутствии гормонов и препарата класса ИП индинавира (IDV 2,5 мкг/мл): β -эстрадиол (26 мкг, 136 мкг) — p24: 3,5 нг/мл и 4,4 нг/мл, соответственно; $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,02$; КВ: 9,0 нг/мл; Прогестерон (26 мкг, 136 мкг) — p24: 2,9 нг/мл и 4, 2 нг/мл соответственно; $p \leq 0,02$ и $p \leq 0,02$; КВ: 9,0 нг/мл. В отсутствии гормонов при добавлении антиретровирусных препаратов (ЗТС, ЕТР, IDV) в той же самой концентрации (2,5 мкг/мл) наблюдалось полное подавление вирусной продукции.

При использовании различных клеток получены одинаковые результаты. Также не было выявлено разницы в результатах при использовании разных схем инфицирования клеточных культур.

Таким образом, в ходе проведенных исследований по изучению влияния женских половых гормонов β -эстрадиола и прогестерона, входящих в состав современных гормональных контрацептивов, было показано, что *in vitro* высокие концентрации стероидных гормонов усиливают вирусную репликацию в 1,3 раза при концентрации 26 мкг/мл и в 1,8 раза при концентрации 136 мкг/мл. Вследствие повышения репликации вируса происходит снижение эффективности действия антиретровирусных препаратов и неполное подавление вирусной активности. Так, подавление репликации вируса при концентрации гормонов 26 мкг/мл и в присутствии препарата класса НИОТ (нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы) для β -эстрадиола составило 92%, для прогестерона — 77% ($p \leq 0,02$ и $p \leq 0,02$, соответственно). При концентрации гормонов 136 мкг/мл подавление репликационной активности для β -эстрадиола отмечалось на 87%, для прогестерона — на 69% ($p \leq 0,01$ и $p \leq 0,02$). Аналогичная картина наблюдалась при репликации вируса в присутствии гормонов и препарата класса НИОТ (ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы). Подавление репликации вируса при концентрации гормонов 26 мкг/мл для

β -эстрадиола отмечалось на 90%; для прогестерона — на 81% ($p \leq 0.01$ и $p \leq 0.02$), и при концентрации гормонов 136 мкг/мл для β -эстрадиола — на 83%; для прогестерона — на 71% ($p \leq 0.02$ и $p \leq 0.02$). Неполное подавление репликации вируса также выявлено при репликации вируса в присутствии высоких концентраций гормонов и препарата класса ИП (ингибиторы протеазы). Подавление репликации вируса при концентрации гормонов 26 мкг/мл для β -эстрадиола отмечалось лишь на 61%; для прогестерона — на 68% ($p \leq 0.02$ и $p \leq 0.02$). При концентрации гормонов 136 мкг/мл ингибирование репликативной активности для β -эстрадиола выявлено на 51%; для прогестерона — на 53% ($p \leq 0.01$ и $p \leq 0.01$). В отсутствии гормонов в инфицированных клетках при добавлении антиретровирусных препаратов различного класса наблюдалось полное подавление вирусной продукции.

Механизмы, в результате которых эстрадиол и прогестерон усиливают активность вируса, не до конца ясны. Но недавние исследования показали, например, что рецептор эстрогена ER α взаимодействует со многими транскрипционными факторами, включая Sp1, AP-1, NF-kB, влияя на их транскрипционную активность [10, 11]. В то же время, хорошо известно, что NF-kB и Sp1 являются ключевыми факторами стимуляции репликации ВИЧ-1. Возможно, что эстраген активирует транскрипцию вируса путем взаимодействия с транскрипционными факторами NF-kB и Sp1. Также было установлено, что прогестерон увеличивает экспрессию CXCR4 (ко-рецептор, играющий ключевую роль в инфицировании клетки-мишени вирусом) на поверхности как неинфицированных, так и инфицированных мононуклеарных клеток [5]. Это позволяет предположить, что прогестерон может оказывать влияние на ВИЧ на рецепторном уровне.

Известно, что физиологический гормональный уровень колеблется в периферической крови и репродуктивных органах женщин в течение менструального цикла. Накоплено достаточно много данных, свидетельствующих о том, что подобная флуктуация уровня гормонов играет важную роль при иммунном ответе организма на ВИЧ-инфекцию и подверженности инфицированию. Показано, что эстрадиол и прогестерон регулируют репликацию ВИЧ-1 в МНК, усиливая репликацию вируса в середине пролиферативной фазы и снижая его репродукцию в середине секреторной фазы [4]. Усиление вирусной репликации под воздействием женских половых гормонов свидетельствует о том, что на эффективность действия антиретровирусных препаратов в значительной степени может влиять гормональный уровень пациента. Учитывая это, женщинам, имеющим высокий риск инфицирования ВИЧ, целесообразно перед назначением гормональной контрацепции проводить мониторинг уровня β -эстрадиола и прогестерона, который может меняться во время менструального цикла и беременности. Женщинам, получающим АРТ и применяющим методы гормональной контрацепции, необходимо проводить одновременный мониторинг уровня гормонов и концентрации антиретровирусных препаратов не только в плазме крови, но и на клеточном уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. ВОЗ. Планирование семьи. Информационный бюллетень. Декабрь 2016 г.
2. ВОЗ. Информационный бюллетень, июль 2018 г.
3. Воронин Е.Е., Афонина Л.Ю., Орлова-Морозова Е.А., Плотникова Ю.К., Радзиховская М.В. Демографические и клинические характеристики ВИЧ-инфицированных женщин в рутинной клинической практике в Российской Федерации: результаты многоцентрового перекрестного неинтервенционного исследования. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017, 3:42-49.
4. Asin S.N., Heimberg A.M., Eszterhas S.K. et al. Estradioland progesterone regulate HIV type 1 replication in peripheral blood cells. AIDS Research and Human Retroviruses. 2008, 24(5):701-716.
5. Cabrera-Munoz E., Fuentes-Romero L.L., Zamora-Chavez J. et al. Effects of progesterone on the content of CCR5 and CXCR4 coreceptors in PBMCs of seropositive and exposed but uninfected Mexican women to HIV-1. J. Steroid Biochemistry and Mol. Biol. 2012, 132:66-72.
6. Heffron R., Mugo N., Ngure K. et al. Hormonal contraceptive use and risk of HIV-1 disease progression. AIDS. 2012, 27:261-267.
7. Lavreys L., Martin H.L. Hormonal contraception and risk of HIV-1 acquisition: results of a 10-year prospective study. AIDS. 2004, 18:695-697.

8. Leclerc P.M., Dubois-Colas N., Garenne M. Hormonal contraception and HIV prevalence in four African countries. *Contraception*. 2008, 77:371-376.
9. Morrison C.S., Richardson B.A., Mmiro F. et al. Hormonal contraception and the risk of HIV acquisition. *AIDS*. 2007, 21:85-95.
10. Schultz J.R., Petz L.N., Nardulli A.M. Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003, 201:165-75.
11. Stein B., Yang M.X. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15:4971-4979.
12. WHO. Hormonal contraceptive eligibility for women at high risk of HIV. Guidance statement: Recommendations concerning the use of hormonal contraceptive methods by women at high risk of HIV. December 2016.
13. WHO. Hormonal contraceptive eligibility for women at high risk of HIV. Updated February 2017.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

О.А.Петруша¹, Т.Л.Черниченко², И.А.Кофиади³, В.В.Зверев^{1,4}, Е.Б.Файзулов¹

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ В ДИАГНОСТИКЕ ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА У ПЛОТОЯДНЫХ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²ООО «Биоцентр», ³ООО «ДНК-Технология», Москва; ⁴Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Цель. Оценка параметров диагностической ценности метода петлевой изотермической амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (real-time LAMP, RT-LAMP) на модели парвовирусов энтерита плотоядных. **Материалы и методы.** Образцы фекалий, крови и мазков из прямой кишки разных видов хищных животных с парвовирусным энтеритом (n=39) и здоровых животных (n=31), а также лабораторные штаммы вируса энтерита норок были проанализированы методом RT-LAMP с использованием красителей SYTO-9 и SYTO-82. В качестве референтного метода использовалась ПЦР в режиме реального времени. **Результаты.** Показано, что метод RT-LAMP на модели парвовирусного энтерита плотоядных обеспечивает высокие показатели аналитической чувствительности ($1,5 \times 10^3$ копий ДНК/мл), диагностической чувствительности и специфичности (до 100% при оптимальных условиях). Краситель SYTO-82 обеспечивал более высокое отношение сигнал/фон ($22,6 \pm 2,1$), чем краситель SYTO-9 ($6,3 \pm 1,5$) ($p < 0,0000001$). Вместе с тем, с красителем SYTO-9 на пределе чувствительности (10 копий ДНК) прирост флуоресценции в реакционной смеси наблюдался на 13 минут раньше, чем для SYTO-82 (23 и 36 минут, соответственно). **Заключение.** Реакция RT-LAMP является перспективным методом для быстрой и высокочувствительной диагностики инфекционных заболеваний на месте лечения, а также в условиях животноводческих хозяйств или в походно-полевых условиях.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 90—95

Ключевые слова: диагностика вирусных инфекций, петлевая изотермическая амплификация ДНК, LAMP, SYTO-9, SYTO-82, парвовирус плотоядных

О.А.Petrusha¹, Т.Л.Chernichenko², I.A.Kofidi³, V.V.Zverev^{1,4}, E.B.Faizuloev¹

EFFECTIVENESS OF THE LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION WITH FLUORESCENT DETECTION IN THE DIAGNOSIS OF PARVOVIRUS ENTERITIS IN CARNIVORES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Company «Biocenter», ³Company «DNA-Technology», Moscow; ⁴Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

The *aim* of the study was to evaluate the diagnostic value of the method of loop-mediated isothermal amplification of DNA with real-time fluorescent detection (real-time LAMP, or RT-LAMP) on the model of carnivore parvoviruses. **Materials and methods.** Samples of feces, blood and swabs from the rectum of different species of predatory animals with parvovirus enteritis (n = 39) and healthy animals (n = 31), as well

as laboratory strains of mink enteritis virus, were analyzed by RT-LAMP using SYTO-9 and SYTO-82 dyes. Real-time PCR was used as a reference method. *Results.* In our study, the LAMP method with real-time fluorescence detection (RT-LAMP) in the carnivore parvovirus enteritis model provides high analytical sensitivity (1.5×10^3 copies of DNA/ml), diagnostic sensitivity and specificity (up to 100% under optimal conditions). Comparison of the two intercalating dyes showed that the SYTO-82 dye provides a higher signal-to-background ratio (22.6 ± 2.1) than the SYTO-9 dye (6.3 ± 1.5) ($p < 0.0000001$). At the same time, SYTO-9 dye at the sensitivity limit (10 copies of DNA) provides an increase in fluorescence in the reaction mixture 13 minutes earlier than for SYTO-82 (23 and 36 minutes, respectively). *Conclusion.* RT-LAMP is a promising method for rapid and highly sensitive «point-of-care» diagnosis of infectious diseases, as well as in conditions of livestock farms or in field conditions.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 90—95

Key words: diagnosis of viral infections, loop-mediated isothermal amplification of DNA, LAMP, SYTO-9, SYTO-82, carnivore parvovirus

ВВЕДЕНИЕ

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), благодаря своей универсальности, высокой специфичности и чувствительности стал «золотым стандартом» диагностики многих инфекционных заболеваний как в медицине, так и в ветеринарии. Однако, применение метода ПЦР для диагностики на месте оказания медицинской помощи («point-of-care»), в походно-полевых условиях или в животноводческих хозяйствах крайне затруднительно. Высокая потребность в средствах диагностики «point-of-care» заставляет исследователей искать подходящие методы, в числе которых особый интерес представляют методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот (ИАНК). Одним из наиболее перспективных методов ИАНК признан метод петлевой изотермической амплификации ДНК, разработанный Notomi T. et al. (LAMP, Loop-mediated Isothermal Amplification) [2]. В состав реакционной смеси LAMP, как правило, входит ДНК-полимераза термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus* (Bst ДНК-полимераза), которая обладает 5'-3'-ДНК-полимеразной активностью, способностью к замещению (вытеснению) цепей ДНК и не проявляет 5'-3'-экзонуклеазной активности. Благодаря использованию Bst ДНК-полимеразы, реакция LAMP проходит при постоянной температуре и не требует применения сложного и дорогого оборудования. Продукты реакции накапливаются в количестве, многократно превышающем количество продуктов ПЦР, что позволяет проводить визуальную детекцию результата прямо в пробирке. В классическом варианте LAMP в состав реакционной смеси входит четыре олигонуклеотидных праймера, что обеспечивает высокую специфичность метода при чувствительности, сопоставимой с ПЦР [1,3].

Существуют разные способы детекции результатов реакции LAMP — электрофоретический, колориметрический, турбидиметрический, флуоресцентный и другие. Использование интеркалирующих красителей ДНК является, на наш взгляд, одним из наиболее перспективных подходов, позволяющим проводить не только визуальную детекцию результата, но также и флуориметрическую детекцию «по конечной точке» или в режиме реального времени. Важно отметить, что инструментальные методы детекции минимизируют риск получения ложноположительных результатов в результате контаминации ампликонами и позволяют количественно определять ДНК-мишень. Проведение реакции ИАНК при постоянной температуре предоставляет возможность конструировать портативные анализаторы (весом менее 2 кг), включающие твердотельный термостат, оптический блок, встроенный или внешний компьютер.

В настоящей работе в качестве модели использованы вирусы энтерита норки (ВЭН), энтерита собак (ВЭС) и панлейкопении кошек (вирус ПЛК), которые относятся к одному виду, роду, подсемейству и семейству. Парвовирусы имеют сферический вирион диаметром 20 нм без оболочки и одноцепочечный ДНК геном. Заболевания, вызванные вирусами вида *Carnivore protoparvovirus 1*, сопровождаются

высокой смертностью и опасны, в первую очередь, для новорожденных и молодых животных. Для диагностики парвовирусного энтерита применяются методы ПЦР и иммуноферментного анализа, требующие отправки образцов в специализированную лабораторию. Экспресс-методы диагностики, такие как латексагглютинация, обладают меньшей чувствительностью. Целью исследования являлась оценка параметров диагностической ценности метода LAMP с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (real-time LAMP, или RT-LAMP) на модели парвовирусов — возбудителей энтерита у плотоядных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы фекалий, крови и мазков из прямой кишки разных видов хищных животных (кошек, собак, норок, лисиц) с парвовирусным энтеритом ($n=39$) и здоровых животных ($n=31$), а также лабораторные культуральные штаммы вируса энтерита норка «Береговой» и «Родники» были предоставлены компанией ООО «Биоцентр».

Для постановки ПЦР использовали праймеры к гену белка VP2 вируса Carnivore protoragovirus 1 и зонд, меченный красителем ROX, описанные в статье Streck A.F. et al. [4]. Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл с использованием набора реагентов «2,5х реакционная смесь для ПЦР-РВ» («Синтол»). Реакционная смесь содержала по 5 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда. ПЦР-РВ проводилась в амплификаторе ДТпрайм («ДНК-технология») в режиме 95°C — 90 сек. (1 цикл); 95°C — 20 сек., 58°C — 40 сек. (45 циклов). Визуальная детекция результатов LAMP и ПЦР-РВ проводилась методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием, а для LAMP также путем добавления 10 мкл стократного разведения раствора SYBR Green I (кат. №S9430, «Sigma-Aldrich») к 10 мкл продуктов реакции амплификации.

Для проведения реакции LAMP использовали праймеры к гену белка VP2 вируса энтерита норка, описанные в статье Wang J. et al. [7]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 8 ед ДНК-полимеразы Bst 2.0 WarmStart («BioLabs», Великобритания), 2,5 мкл 10х буфера для Bst полимеразы, $MgSO_4$ 8 мМ, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов 2 мМ каждого («Синтол», Россия), по 5 пмоль каждого из внешних (M-F3 и M-B3) и по 15 пмоль внутренних (M-FIP и M-BIP) праймеров, краситель SYTO-9 или SYTO-82 (Invitrogen, США). Реакцию проводили в амплификаторе ДТпрайм («ДНК-Технология», Россия) в режиме 65° С — 60 мин; 80° С — 10 мин. Для регистрации флуоресценции красителей SYTO-9 и SYTO-82 использовали цветовые каналы FAM и R6G, соответственно.

Для определения оптимальной концентрации красителей SYTO-9 и SYTO-82 и отношения сигнал/фон использовали их в концентрации 0,5 мкМ, 1 мкМ и 2 мкМ. Выделение ДНК из клинических и контрольных образцов производили с помощью набора реагентов РИБО-преп (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Отношение сигнал/фон определяли на основе данных амплификатора ДТпрайм путем деления максимального значения флуоресценции на значение флуоресценции до начала роста сигнала. Вычисление проводилось для каждой реакции отдельно. Время появления сигнала в LAMP (значение T_t) и значение порогового цикла в ПЦР (ПЦ) определялось автоматически с помощью программы RealTime PCR v.7.7 («ДНК-Технология») на основе математического анализа формы кривой амплификации (метод геометрический, C_p). Все праймеры и зонды синтезированы в ООО «ДНК-Синтез» (Россия).

Для оценки аналитической чувствительности реакции LAMP использовали последовательные десятикратные разведения ДНК ВЭН штамма «Береговой» с известной концентрацией от $1,5 \times 10^7$ до $1,5 \times 10^1$ копий/мл. Диагностическую чувствительность LAMP рассчитывали определением доли положительных результатов LAMP для образцов, в которых методом ПЦР-РВ была обнаружена ДНК парвовируса плотоядных. Диагностическую специфичность LAMP рассчитывали определением доли отрицательных результатов LAMP для образцов, в которых методом ПЦР-РВ не была обнаружена ДНК парвовируса плотоядных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании J. Wang et al. [7] показана высокая эффективность метода LAMP в диагностике парвовирусного энтерита норок. В работе продукты амплификации визуализировали методом электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием либо добавлением в реакционную смесь красителя SYBR Green I. Поскольку применение этих методов детекции сопряжено с высоким риском контаминации исследуемых образцов ампликонами и получения ложноположительных результатов, мы на данной модели исследовали эффективность RT-LAMP флуоресцентной детекцией результатов.

Основным требованием к интеркалирующим красителям ДНК для детекции результатов RT-LAMP является их неспособность в рабочей концентрации ингибировать активность ДНК-полимеразы. Важным показателем для системы детекции в режиме реального времени также является отношение интенсивности положительного сигнала к фоновому свечению, или отношение сигнал/фон. Высокие значения данного показателя обеспечивает надежную трактовку результата как при флуориметрической детекции результата в режиме реального времени, так и по конечной точке. В эксперименте по RT-LAMP анализу клинических образцов мы определили отношение сигнал/фон для двух интеркалирующих красителей ДНК — SYTO-9 и SYTO-82, которые, как показано в предыдущих исследованиях [5,6], в наименьшей степени ингибируют Bst ДНК-полимеразу. Краситель SYTO-82 показал более высокое и стабильное отношение сигнал/фон ($22,6 \pm 2,1$), чем краситель SYTO-9 ($6,3 \pm 1,5$) ($p < 0,0000001$). При анализе ДНК штамма ВЭН «Береговой», полученного в культуре клеток, признаков ингибирования реакции названными красителями в диапазоне концентраций 0,5 — 2 мкМ не выявлено. Однако при постановке реакции с клиническими образцами от норок было отмечено, что время появления сигнала (значение T_t) и его нарастания до максимальных значений для SYTO-9 значительно меньше, чем у SYTO-82. В среднем сигнал в реакциях в присутствии SYTO-9 появлялся на 2 мин (при концентрации 1 мкМ) ($p < 0,001$) и на 5 минут (при концентрации 2 мкМ) ($p < 0,0017$) раньше, чем в реакции с тем же клиническим образцом в присутствии SYTO-82. При этом при повышении концентрации красителя SYTO-82 отмечались признаки ингибирования реакции. Так, при концентрации SYTO-82 в 1 мкМ сигнал появлялся в среднем на 3 мин раньше, чем при концентрации 2 мкМ ($p < 0,021$). В реакциях с SYTO-9 изменений значения T_t в зависимости от концентрации красителя не наблюдалось.

Для оценки аналитической чувствительности реакции LAMP использовали последовательные десятикратные разведения ДНК ВЭН (штамм «Береговой») с известной концентрацией. Чувствительность LAMP составила $1,5 \times 10^3$ копий ДНК/мл, тогда как чувствительность ПЦР-РВ составила менее $1,5 \times 10^2$ копий ДНК/мл (табл.).

В качестве референтного метода выявления результатов LAMP применяли электрофорез в агарозном геле с бромистым этидием и прямое окрашивание продуктов амплификации в микропробирках. При добавлении раствора SYBR Green I в реакционную смесь наблюдалось окрашивание реакционной смеси в зеленый цвет в случае положительной реакции и в светло-коричневый цвет в образцах с отрицательным

Сравнение аналитической чувствительности методов ПЦР-РВ и RT-LAMP

Копий ДНК на реакционную смесь	Копий ДНК в мл	Результат LAMP, значение T_t , минут		Результат ПЦР, значение ПЦ
		SYTO-9	SYTO-82	
3750	150000	$18,7 \pm 0,63$	$23,3 \pm 0,32$	$31,1 \pm 0,4$
375	15000	$21,4 \pm 0,98$	$27,9 \pm 0,93$	$34,2 \pm 0,21$
37,5	1500	$23,5 \pm 1,5$	$36,3 \pm 5,76$	$37,3 \pm 0,17$
3,75	150	0	45,1*	$40,7 \pm 0,98$
0,37	15	0	0	$41,3 \pm 0,2^{**}$

Примечание. * Одна положительная реакция из четырех, ** две положительные реакции из четырех.

результатом. При облучении пробирок ультрафиолетом ($\lambda=320$ нм) в положительных образцах наблюдается ярко-зеленое свечение, отсутствующее в отрицательных образцах.

Одной из характеристик реакции LAMP является высокая скорость накопления продуктов амплификации. Так, например, клинические образцы с высоким содержанием вирусной ДНК (до 2×10^{11} копий/мл) давали прирост флуоресценции с красителем SYTO-9, начиная уже с четвертой минуты реакции. На пределе чувствительности (10 копий ДНК на реакционную смесь) достоверный прирост флуоресценции в реакционной смеси наблюдался через 23 минуты (SYTO-9) и 36 минут (SYTO-82), тогда как в ПЦР-РВ выявление того же количества ДНК требует примерно 74-76 минут. Графики флуоресценции, полученные для красителя SYTO-82, отличались по форме и характеризовались значительным отклонением от сигмоидной функции, наилучшим образом описывающей данный тип накопления сигнала. Наличие таких отклонений, особенно в начальной фазе роста флуоресценции, свидетельствует о неоптимальных условиях реакции или наличии ингибиторов. На эффективность RT-LAMP в данном случае мог повлиять сам краситель SYTO-82. Однако эта гипотеза требует подтверждения в дополнительных экспериментах.

Для определения диагностической чувствительности и специфичности реакции LAMP использовали центрифугаты кала от 5 норок с лабораторно-подтвержденным (ПЦР-РВ) парвовирусным энтеритом, в том числе двух животных, экспериментально зараженных штаммами ВЭН «Береговой» и «Родники». Также использовали 34 образца крови, кала и ректальных смывов от больных животных, в которых методом ПЦР-РВ было подтверждено наличие ДНК парвовируса плотоядных, и 31 образец от здоровых животных, давших отрицательный результат в ПЦР-РВ. Все образцы были проанализированы в реакции RT-LAMP с красителем SYTO-82. В результате RT-LAMP анализа ДНК парвовируса плотоядных была обнаружена у 32 животных с парвовирусным энтеритом.

Несмотря на то, что метод LAMP по, нашим данным, несколько уступает по аналитической чувствительности методу ПЦР-РВ, он показал 100% диагностическую чувствительность на образцах от норок и кошек. Однако при анализе образцов от собак выявлено два случая несоответствия (результаты положительные в ПЦР, но отрицательные в RT-LAMP), а доля сопоставимых с ПЦР-РВ результатов составила 91%. Более низкая диагностическая чувствительность RT-LAMP на образцах от собак может быть объяснена тем, что праймеры для LAMP были подобраны и рекомендованы авторами [7] для выявления ДНК ВЭН, но не филогенетически близкого ВЭС. Действительно, проведенный нами анализ нуклеотидных последовательностей геномов ВЭС из базы данных GenBank (NCBI) позволил выявить у некоторых штаммов несовпадения в сайтах связывания праймеров для LAMP, способные ухудшить диагностическую чувствительность.

В образцах здоровых животных ДНК парвовируса не обнаружена, следовательно, диагностическая специфичность LAMP составила 100%.

Таким образом, полученные результаты показали, что при детекции результатов LAMP по конечной точке предпочтительным является использование красителя SYTO-82, обеспечивающего большее отношение сигнал/фон. Тогда как при флуоресцентной детекции в режиме реального времени лучше использовать SYTO-9, поскольку он обеспечивает более быстрое получение результата. Метод RT-LAMP обеспечивает высокую чувствительность и специфичность выявления ДНК парвовируса плотоядных в клинических образцах, при этом время проведения реакции, позволяющее достичь максимальной аналитической чувствительности, составляет 30-40 мин. Выявленная нами на порядок более низкая аналитическая чувствительность метода RT-LAMP по сравнению с ПЦР-РВ не способна ухудшить диагностическую чувствительности, поскольку парвовирусный энтерит характеризуется крайне высокой концентрацией вирусной ДНК в фекалиях. Так, средняя концентрация парвовирусной ДНК в исследованных нами клинических образцах составила $2,8 \times 10^{10}$ копий/мл.

Реакция LAMP является перспективным методом для быстрой и высокочувствительной диагностики инфекционных заболеваний «point-of-care», а также в

условиях животноводческих хозяйств или в походно-полевых условиях. Однако, для его внедрения в лабораторную практику требуется решить ряд проблем. Учет результатов в нашей работе проводился в амплификаторе ДТпрайм, разработанном для постановки и учета результатов ПЦР-РВ, однако изотермический характер реакции LAMP позволяет проводить детекцию в более простых, недорогих и компактных приборах. Компании Eiken Chemical (Япония) и OptiGene Limited (Великобритания) уже разработали и внедрили подобные приборы, основанные на методах турбидиметрии или флуориметрии с детекцией в режиме реального времени. Актуальной остается разработка и внедрение портативного термостатируемого флуориметра отечественного производства для постановки ИАНК. Важной проблемой остается также создание упрощенных систем пробоподготовки, позволяющих быстро и с минимальным риском контаминации подготовить образцы к анализу во внелабораторных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Craw P., Balachandra W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip*. 2012, 12(14):2469-2486.
2. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28(12): E63.
3. Notomi T., Mori Y., Tomita N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*. 2015, 53 (1):1-5.
4. Streck A.F., Rüster D., Truyen U. et al. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. *J. Virol. Meth.* 2013, 193:6-8.
5. Seyrig G., Stedtfeld R., Turlouise D. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics. *J. Microbiol. Methods*. 2015, 119:223-227.
6. Ocorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*. 2016, 61(1):20-5.
7. Wang J., Cheng S., Yi L. et al. Detection of mink enteritis virus by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Virol. Meth.* 2013, 187:401-405.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

А.В.Солдатенкова, Е.М.Зимина, А.М.Кудряшова, Н.Ф.Гаврилова, И.В.Яковлева, О.В.Борисова, В.В.Свиридов, Н.А.Михайлова

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Разработка и оптимизация иммуноферментных методов для контроля качества рекомбинантной вакцины синегнойной. **Материалы и методы.** Рекомбинантные белки в промежуточных продуктах и при контроле полноты сорбции выявляли в «сэндвич» вариантах твердофазного ИФА с использованием специфических поликлональных и моноклональных антител. Определение антигена в вакцине проводили по остаточному количеству антител, специфичных к анатоксину или OprF, не связавшихся с вакцинным препаратом в процессе предварительной инкубации. **Результаты.** Разработаны и оптимизированы ИФА для количественного определения компонентов (анатоксина и мембранного белка OprF) рекомбинантной вакцины синегнойной в процессе производства. Установлено, что методики являются специфичными для определения анатоксина и OprF, предел их количественного определения обладает приемлемой надежностью, показана возможность выбора интерполяции калибровочной зависимости в пределах аналитической области, правильность и прецизионность удовлетворяют критериям приемлемости, методика устойчива в условиях проведения анализа. **Заключение.** Методы могут быть использованы для контроля качества препарата в процессе его изготовления и хранения.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 95—100

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белок наружной мембраны OprF, анатоксин, иммуноферментный анализ, рекомбинантная вакцина синегнойная

DEVELOPMENT OF ELISAS FOR THE QUALITY CONTROL OF A RECOMBINANT PSEUDOMONAS VACCINE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Development and optimization of enzyme immunoassays for quality control of pseudomonas recombinant vaccine. **Materials and methods.** Recombinant proteins in intermediate products and for completeness of adsorption control were detected in sandwich immunoassay using specific polyclonal and monoclonal antibodies. Detection of the antigen in the vaccine was carried out on the residual amount of antibodies specific to toxoid or OprF that did not bind to the vaccine preparation during the preincubation. **Results.** ELISAs have been developed and optimized for the quantitative determination of the components (toxoid and membrane protein OprF) of the Pseudomonas recombinant vaccine during the production process. It has been established that: the methods are specific for the determination of toxoid and OprF, the quantitative limit determination has acceptable reliability, the possibility of choosing interpolation of the calibration dependence within the analytical area is shown, the accuracy and precision meets the acceptance criteria, the technique is stable under the conditions of the analysis. **Conclusion.** Methods can be used to control the quality of the drug during its developing and storage.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 95–100

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, OprF outer membrane protein, toxoid, enzyme immunoassay, recombinant pseudomonas vaccine

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для профилактики и лечения заболеваний, вызываемых *Pseudomonas aeruginosa*, проводят вакцинацию, антибиотикотерапию и фаготерапию. Однако многочисленные исследования показывают, что широкое бесконтрольное применение антибиотиков привело к серьезному ограничению в вариантах лечения и вскрыло проблему антибиотикорезистентности возбудителя. В связи с этим вакцинопрофилактика приобрела приоритетное значение в борьбе с синегнойной инфекцией.

В НИИВС им. И.И. Мечникова разработана рекомбинантная вакцина, предназначенная для профилактики синегнойной инфекции, проходящая в настоящее время доклинические испытания. Препарат состоит из двух протективных рекомбинантных белков *P. aeruginosa*, сорбированных на гидроксиде алюминия [3,6]. Для доклинических испытаний получены три серии рекомбинантной синегнойной вакцины (РВС). Целью настоящего исследования является разработка иммуноферментных методов для контроля качества препарата, позволяющих выявлять отдельные компоненты до их сорбции на гидроксиде алюминия, так и определять количественный состав готового вакцинного препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рекомбинантные белки OprF [2] (четыре серии) и анатоксин [1] (аТох; четыре серии), 3 серии вакцины РВС [3,6], конъюгаты (КГ) моноклональных антител с пероксидазой хрена, специфичные к OprF (№ 1, 5) и специфичные к анатоксину (№ 21) [Солдатенкова А.В. и др., 2013].

Поликлональные антитела кролика выделяли из иммунных сывороток путем осаждения сульфатом аммония и хроматографической очистки на иммунном сорбенте. Сыворотку крови кроликов получали четырехкратной иммунизацией с двухнедельным интервалом анатоксином в дозе 50 мкг/животное с адъювантом. Забор крови осуществляли через две недели после последнего введения. Конъюгаты антител с пероксидзой хрена готовили по методу Nakane P.K. and Kawoi A.A. [9]. Стандартные серии рекомбинантных белков и вакцинных препаратов получали со-

гласно методикам, разработанным в НИИВС им. И. И. Мечникова [1,2]. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Milli-Q System, Millipore, США). Для проведения ИФА использовали 96-луночные планшеты (Costar).

Оптическую плотность измеряли на аппарате BioRad Model 680. Инкубацию планшетов проводили на термостатируемом планшетном встряхивателе (ELMI SkyLine) при режиме 500 об/мин и температуре 37 °С. После всех инкубаций проводили отмывку планшетов на планшетном промывателе (StatFax).

В «сендвич» варианте ИФА для выявления рекомбинантного анатоксина использовали специфические поликлональные антитела кролика для захвата и моноклональные антитела мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (ПХ), в качестве детектирующих. Выявление OprF осуществляли с использованием пары специфичных моноклональных антител.

В 96-луночные планшеты вносили по 100 мкл поликлональных антител к анатоксину или моноклональных антител к OprF в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2. Параллельно анализировали разведения стандартной и исследуемой серии рекомбинантного белка. Планшеты выдерживали в течение 19-22 ч при температуре (4-8) °С. Далее вносили образцы, содержащие рекомбинантный анатоксин или OprF в различных разведениях в 0,02 М фосфатном буфере pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20 и выдерживали при температуре 37 ± 2 °С и постоянном встряхивании со скоростью 500 об/мин в течение 1 ч. На второй стадии анализа, после отмывки, в лунки вносили 100 мкл конъюгата (КГ), соответственно, моноклональных антител к анатоксину или OprF, конъюгированных с пероксидазой хрена, и повторяли этап инкубирования в течение 30 ± 2 мин. После отмывки вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм. Калибровочные графики зависимости оптической плотности от концентрации белка строили на основании данных, полученных для стандартных серий соответствующих рекомбинантных белков.

Выявление анатоксина и OprF в вакцинных препаратах проводили следующим образом: параллельно анализировали разведения стандартной и исследуемой серии вакцины. На первой стадии в пробирках смешивали конъюгат моноклональных антител с пероксидазой хрена, специфичных к анатоксину или OprF, с разными разведениями образцов (от 0,5 до 10 мкг/мл в пересчете на анатоксин или на OprF) и выдерживали пробы при температуре 22 ± 4 °С в течение 40 мин, периодически перемешивая. Образовавшийся комплекс антител, меченных пероксидазой, с антигеном (АГ), сорбированным на геле гидроксида алюминия, отделяли центрифугированием. Не связавшиеся антитела, меченные ПХ, оставшиеся в надосадочной жидкости, исследовали методом иммуноферментного анализа.

Для постановки ИФА использовали полистироловые планшеты, сенсibilизированные аТох или OprF. В лунки планшета вносили по 100 мкл надосадочной жидкости и инкубировали в течение 30 мин в шейкере при температуре 37 ± 2 °С, скорости вращения 500 об/мин. Ферментативную реакцию регистрировали, как описано выше.

Строили калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации рекомбинантных анатоксина или OprF в стандартной серии. Регистрируемая оптическая плотность была обратно пропорциональна концентрации аТох или OprF в анализируемых образцах.

В каждом случае проводили подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности. Чувствительность оценивали путем определения предела обнаружения (ПО) и предела количественного обнаружения (ПКО). ПО определяли по калибровочному графику как концентрацию препарата, соответствующую пороговому значению оптической плотности (ОП порог.), определяемому по формуле: $ОП_{порог.} = ОП_{ср.К} - \pm 3\sigma$, ПКО определили по калибровочному графику как концентрацию препарата, соответствующую пороговому значению оптической плотности, определяемому по формуле: $ОП_{порог.} = ОП_{ср.К} - \pm 10\sigma$, где $ОП_{ср.К}$ —

среднее арифметическое значение ОП нулевой пробы, σ — среднее квадратическое отклонение ОП нулевой пробы (8 повторов).

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2013.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для количественной оценки рекомбинантных антигенов до сорбции на геле гидроксида алюминия оптимизированы твердофазные иммуноферментные двухстадийные сэндвич-методы.

На основании результатов исследований токсичности, иммуногенности и подлинности по одной серии рекомбинантных белков ОргF и аТох и вакцины были определены как стандартные. Проведена оптимизация всех стадий иммуноферментного анализа: подобраны пары иммобилизованных и детектирующих антител, их концентрации, время и режим инкубаций, концентрации конъюгатов. Для выявления анатоксина оптимальной парой антител оказались поликлональные антитела кролика в качестве иммобилизованных в концентрации 5 мкг/мл и КГ моноклональных антител № 21 с пероксидазой хрена в разведении 1:80 000. В методе для выявления ОргF оптимальная концентрация иммобилизованных антител (МкАт № 5) соответствовала 2 мкг/мл КББ, в качестве детектирующих антител использовали МкАт № 1, меченные ПХ в концентрации 1:80 000. Содержание анатоксина или ОргF в исследуемых образцах определяли по калибровочному графику зависимости оптической плотности от количественного содержания аТох или ОргF в разведениях стандартных серий с известным содержанием белков. Типичные калибровочные графики представлены на рис. 1 (А,Б).

Проведена оценка валидационных параметров методик для количественного определения анатоксина и ОргF по следующим параметрам: специфичность методики, предел количественного определения, правильность, точность, сходимость, воспроизводимость и устойчивость методики [4,5,8].

Разработанные методы были специфичны для выявления анатоксина и ОргF, соответственно, присутствие второго компонента вакцины не влияло на предел количественного обнаружения. ПКО обеспечивает необходимую чувствительность для определения аТох и ОргF до сорбции и при определении остаточных белков после сорбции на гидроксида алюминия и составляет менее 0,1% от содержания рекомбинантных белков в вакцинном препарате. Тест на линейность при разведении соответствовал валидационным критериям, показал отклонение не более чем на 20 %.

Оптимизация методик оценки количественного содержания рекомбинантных белков в составе вакцины выполнена с использованием стандартной серии вакцины с содержанием аТох 100 мкг/мл и ОргF 50 мкг/мл. Оптимальная концентрация анатоксина или ОргF, иммобилизованных на поверхности лунок планшета, составила 2 мкг/мл в КББ для обоих рекомбинантных белков, рабочие разведения конъюгатов МкАт-ПХ соответствовали 1:80 000. Калибровочные

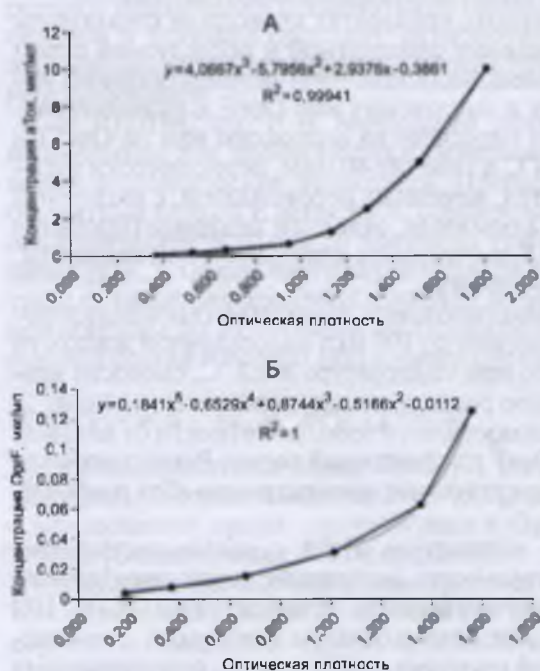


Рис. 1. Калибровочные графики зависимости оптической плотности от концентрации аТох (А) и ОргF (Б) (мкг/мл).

графики и аналитические характеристики методов для количественной оценки рекомбинантных белков в вакцине представлены на рис. 2 и в табл. Предел количественного обнаружения составил не более 1,5% от номинального содержания антигена в вакцине.

Контроль качества сорбированной вакцины предполагает количественное определение содержания компонентов в промежуточных и конечном продуктах. Одним из подходов количественного определения антигена в адсорбированном препарате является десорбция компонентов с частиц гидроокиси алюминия [10].

В настоящем исследовании использован альтернативный подход, предполагающий определение антигена в исследуемой вакцине по остаточному количеству антител, специфичных к анатоксину или OprF, не связавшихся с вакцинным препаратом в процессе предварительной инкубации.

В отличие от описанных аналогичных подходов [7], [EP 2 705 365 B1. Immunoassay for direct determination of antigen content of products comprising adjuvant-coupled-antigen particles; US 2004/0033545 A1. Competitive enzyme immunoassay for assessing total antigen content of aluminum-adsorbed antigens] для инкубации с вакцинными препаратами использовали специфические моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой, что позволяло проводить их выявление прямым твердофазным иммуноферментным методом только в одну стадию. Методика, разработанная для количественного определения адсорбированного на гидроокиси алюминия антигена, включала стадию центрифугирования, что сводило к минимуму влияние гидроокиси алюминия на результаты иммуноферментного анализа.

В результате проведенной валидации установлено, что методики являются специфичными для определения анатоксина и OprF, предел их количественного определения обладает приемлемой надежностью, показана возможность выбора интерполяции калибровочной зависимости в пределах аналитической области, правильность и прецизионность удовлетворяют критериям приемлемости, методика устойчива в условиях проведения анализа.

Таким образом, разработаны и оптимизированы варианты ИФА для количественного определения компонентов (анатоксина и мембранного белка OprF) рекомбинантной вакцины синегнойной в процессе производства. Методы могут быть использованы для контроля качества препарата в процессе его изготовления и хранения.

Работа выполнена в рамках Государственного Контракта от 28 апреля 2017г. № 14. N08.11.0135 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой».

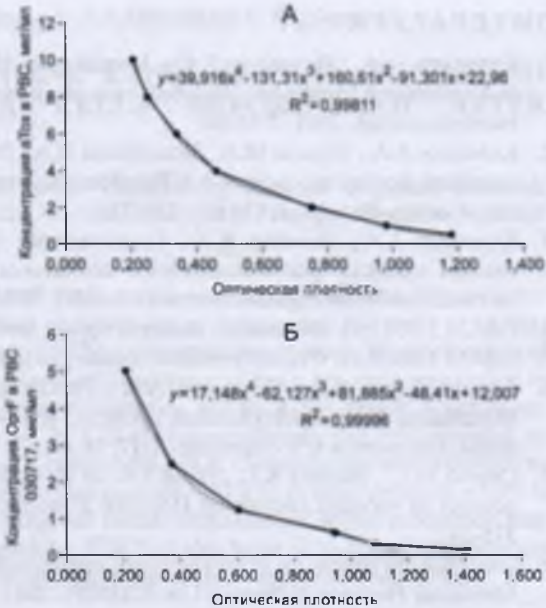


Рис. 2. Калибровочные графики с обратной зависимостью для количественного определения аТох (А) и ОпрF (Б) в вакцине (мкг/мл).

Результаты определения аТох и ОпрF в двух сериях вакцины PBC-2 и PBC-3

Серия вакцины	PBC-2	PBC-3
Номинальное значение аТох, мкг/мл	100	100
Рассчитанное значение аТох, мкг/мл	104,9±2,4	101,1±2,9
КВ %, анатоксин	8,0	5,0
Номинальное значение ОпрF, мкг/мл	50	50
Среднее значение ОпрF, мкг/мл	50,03±2,6	45,4±3,2
КВ%, ОпрF	5,0	7,2

ЛИТЕРАТУРА

1. Калошин А.А., Гатыпова Е.В., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств. Биотехнология. 2011, 2:74-84.
2. Калошин А.А., Исаков М.А., Михайлова Н.А., Вертиев Ю.В. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 154 (9): 330-335.
3. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2016, 71 (1): 5-10.
4. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик.
5. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов эксперимента.
6. Солдатенкова А.В., Калошин А.А., Поддубиков А.В., Зимина Е.М., Калинин Е.О., Михайлова Н.А. Протективные свойства и безопасность рекомбинантной синегнойной вакцины. Цитокины и воспаление. 2017, 16 (4): 73-75.
7. Cuervo M.L., Sterling A.L., Nicot I.A. et al. Validation of a new alternative for determining in vitro potency in vaccines containing Hepatitis B from two different manufacturers. Biologicals. 2008, 36: 375-382.
8. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). 2011.
9. Nakane P.K., Kawoi A.A. New method of conjugation. Histochem. Cytochem. 1974, 22:1084-1091.
10. Shanmugham R., Thirumeni N., Rao V.S. et al. Immunocapture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Assessment of In Vitro Potency of Recombinant Hepatitis B Vaccine. Clinical and Vaccine Immunology. 2010, 17 (8): 1252-1260.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

А.Б.Филина^{1,3}, О.А.Свищич^{1,3,4}, Ю.И.Аммур¹, А.К.Голенков², Е.Ф.Клинушкина², В.В.Зверев^{1,3}

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ CXCL12, CCR4, EGFR В МИГРИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ МИЕЛОМОНОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ДО И ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ

¹НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова, ²Московский областной клинический НИИ им.М.Ф.Владимирского, ³Первый московский государственный медицинский университет им.И.М.Сеченова, ⁴Российский национальный научно-исследовательский медицинский университет им.Н.И.Пирогова, Москва

Цель. Изучение влияния CXCL12 на миграцию мононуклеарных клеток, выделенных от здоровых пациентов, пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии, а также исследование экспрессии генов CCR4, EGFR, CXCL12 после воздействия CXCL12. **Материалы и методы.** Исследовался хемотаксис мононуклеарных клеток (МНК) здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом в камере Бойдена с последующим выделением РНК, проведение обратной транскрипции и ПЦР-РВ. **Результаты.** Выявлено достоверное усиление хемотаксиса по направлению к CXCL12 клеток МНК миеломонобластного лейкоза после проведенной химиотерапии, а также снижение экспрессии данного хемокина в опухолевых клетках до химиотерапии после воздействия на него CXCL12. **Заключение.** Предположительно опухолевые клетки сами продуцируют CXCL12 в большом количестве, что необходимо для нарушения межклеточных взаимодействий и дальнейшей интравасии, продукция которого может снижаться при внешней стимуляции этим же хемокином. CXCL12 также способствует повышению уровня экспрессии EGFR и CCR4, что приводит к усилению пролиферации опухоли и миграции опухолевых клеток.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 100—104

Ключевые слова: хемотаксис, CXCL12, лейкоз, хемокины, камера Бойдена

STUDY OF CXCL12, CCR4, EGFR GENE EXPRESSION IN MIGRATING MYELOMONOBLASTIC LEUKEMIA CELLS BEFORE AND AFTER CHEMOTHERAPY

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Vladimirskiy Moscow Regional Research Clinical Institute, ³Sechenov First Moscow State Medical University, ⁴Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Aim. A study of CXCL12 effect on the migration of mononuclear cells isolated from healthy patients, from patients with myelomonoblastic leukemia before and after chemotherapy and the study of CCR4, EGFR and CXCL12 genes expression after exposure to CXCL12. **Materials and methods.** The chemotaxis of mononuclear cells (MNCs) of healthy donors and patients with myelomonoblastic leukemia was studied in a Boyden chamber, followed by isolation of RNA, reverse transcription and PCR-RV. **Results.** A significant increase in myelomonoblastic cell chemotaxis towards CXCL12 after chemotherapy was demonstrated, as well as a decrease in the expression of this chemokine in tumor cells before chemotherapy after exposure to CXCL12. **Conclusion.** Presumably, the tumor cells themselves produce CXCL12 in large amounts, which is necessary for the disturbance of intercellular interactions and further intravasation, whose production may decrease with external stimulation by the same chemokine. CXCL12 also helps to increase the expression level of EGFR and CCR4, which leads to increased tumor proliferation and migration of tumor cells.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 100—104

Key words: chemotaxis, CXCL12, leukemia, chemokines, Boyden chamber

ВВЕДЕНИЕ

Исследования в области онкологических заболеваний активно ведутся уже более двух столетий, однако, иммунологические аспекты опухолевой прогрессии изучаются совсем недавно. Важнейшими участниками онкологического процесса являются хемокины, которые участвуют не только в миграции опухолевых клеток, но также способствуют активному росту опухоли и ангиогенезу в солидные опухоли [2,5].

По данным многочисленных исследований, показано, что такие хемокины как CXCL12, CCL2, CCL3 и CCL5 являются активными участниками ангиогенеза. CXCL12, CCL2, CCL3 и CCL5 активируют миграцию клеток-предшественников эндотелия (endothelial precursor cells — EPCs) с помощью митоген-активированных протеинкиназных путей (Janus kinase 2 (JAK2) — STAT5) и p3893, что ведет к ангиогенезу. CXCL12 также может активировать пролиферацию эндотелия сосудов через активацию рецептора CXCR4 на поверхности эндотелиальных клеток [2,5,6].

Другой важнейшей функцией хемокинов является способность активировать миграцию иммунных клеток в микроокружение опухоли, так называемый рекрутинг. Под действием хемокинов, в основном таких как CCL20, CXCL14, CXCL12, CCL2, CXCL8, в опухолевую ткань мигрируют антигенпрезентирующие клетки (дендритные клетки, макрофаги, миелоидные супрессорные клетки, В-клетки), которые оказывают противоопухолевый эффект, подавляя активированные опухолевыми антигенами CD8+ Т-клетки [6,7].

Показано, что хемокины участвуют в миграции опухолевых клеток. На данный момент по научным данным известно, что по меньшей мере двадцать три типа опухолей экспрессируют CXCR4, способствуя миграции опухолевых клеток к CXCL12 по градиенту концентрации. Большинство исследований, направленных на изучение миграции опухолевых клеток к CXCL12, показывают, что повышенная экспрессия CXCR4 коррелирует с плохим прогнозом и более низким уровнем выживаемости у пациентов с онкологическими заболеваниями, в частности при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ). Однако, последние годы появляются новые данные, которые указывают на неоднозначность участия CXCL12 и его рецепторов в прогрессии опухоли. Luke J. Drury и его коллеги (2011) обнаружили, что хемотаксис клеток зависит от олигомерного состояния хемокина: мономерный вид и мутантный димерный белок

CXCL12 снижали хемотаксис опухолевых клеток, способствуя их гибели. Logena Hernandez и ее коллеги (2011) также показали, что в зависимости от уровня экспрессии рецепторов CXCL12 (CXCR4 и CXCR7), данный хемокин проявляет разное действие на опухолевую клетку.

С учетом данных последних исследований и неоднозначности участия CXCL12 в регуляции опухолевой прогрессии в нашей работе была поставлена цель изучить влияние CXCL12 на миграцию моноклеарных клеток, выделенных от здоровых пациентов, пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии, а также изучить экспрессию генов CCR4, EGFR, CXCL12 после воздействия CXCL12.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были отобраны здоровые доноры в возрасте 20-40 лет ($n=10$), у которых не было иммунодефицитных состояний, онкологических, аутоиммунных заболеваний, а также инфекционных заболеваний для формирования группы контроля. Во второй клинической группе были пациенты в возрасте 20-50 лет ($n=5$) с миеломонобластным лейкозом без наличия сопутствующих инфекционных, иммунодефицитных и аутоиммунных заболеваний до и после химиотерапии цитозаром и даунорубицином (пациенты отделения клинической гематологии и иммунотерапии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского).

Для выделения моноклеарных клеток (МНК) использовался Diacoll-1077 (Диа-М, Россия). Для исследования хемотаксиса использовалась камера Бойдена фирмы MERCK MultiScreen Migration Invasion and Chemotaxis Filter Plate (Германия) с размерами пор 5 и 8 мкм. В качестве хемоаттрактанта использовался CXCL12 (ThermoFisher, США). В качестве контроля использовали среду RPMI-1640 (ПанЭко, РФ). Выделение РНК из клеток проводилось с помощью набора «РИБО-сорб» (ИЛС, РФ), далее проводили реакцию обратной транскрипции с помощью «Набора реагентов ОТ-1» (ИЛС, РФ) и ПЦР-РВ («Набор реагентов с SYBR Green I», Синтол, РФ) на амплификаторе ДТпрайм («ДНК-Технология», РФ). Последовательности праймеров для исследования экспрессии CCR4, EGFR, CXCL12 были получены из GeneBank (NCBI), после чего синтезированы компанией Синтол (РФ).

Были выделены МНК от здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии методом центрифугирования в градиенте плотности. На первом этапе оценивали количество мигрировавших клеток. Динамику миграции оценивали через 10, 60 мин и через сутки. В верхний отсек камеры помещалась взвесь клеток в объеме 60 мкл и количестве $60 \pm 1 \times 10^3$. В нижний отсек камеры вносили хемоаттрактант в объеме 175 мкл в концентрации 200 нг/мл (CXCL12) и контроль.

На втором этапе исследовалась экспрессия генов CCR4, EGFR, CXCL12 в контрольных образцах и активированных клетках. Уровень экспрессии оценивали относительно уровня β -актина. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной статистической программой BioStat, а также программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе мы оценивали миграцию МНК от здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом. Миграция моноклеарных клеток здоровых доноров относительно CXCL12 была достоверно выше миграции контроля в 2 раза через 60 минут и 24 часа. Миграция МНК от пациентов с миеломонобластным лейкозом до начала химиотерапии под действием CXCL12 и в контроле не имела достоверных отличий, однако была достоверно ниже миграции клеток здоровых доноров под действием CXCL12 через 10 минут, 60 минут и 24 часа в 9 раз. Миграция МНК от пациентов после химиотерапии относительно CXCL12 была достоверно выше контроля в 1,5 раза через час, но через 10 минут и сутки достоверных отличий не было. Миграция МНК от пациентов после химиотерапии относительно CXCL12 была достоверно выше миграции МНК от пациентов до химиотерапии через 10 минут

в 4 раза и совпадала с количеством мигрировавших МНК от здоровых доноров через 10 минут. Через 60 минут миграция МНК от пациентов после химиотерапии к CXCL12 была достоверно выше миграции МНК от пациентов до химиотерапии в 3,5 раза, однако через 24 часа достоверных отличий не было (рис.).

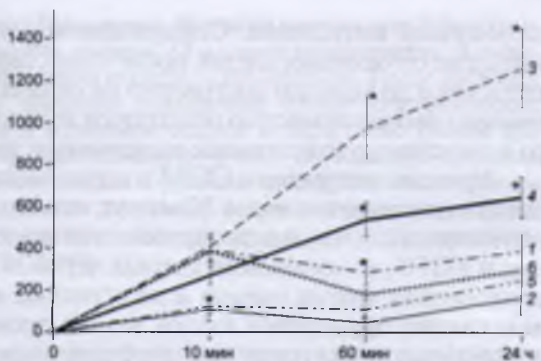
На втором этапе оценивалась экспрессия CCR4, EGFR, CXCL12. Экспрессия гена CXCL12 под воздействием CXCL12 не изменялась на протяжении всего эксперимента в МНК от здоровых доноров, а также достоверно не отличалась от экспрессии гена CXCL12 в интактных клетках (в контроле). Экспрессия гена CXCL12 в интактных МНК от пациентов с миеломонобластным лейкозом была достоверно выше контроля через 10 минут и через 60 минут в 16 и 4 раза соответственно, достоверных отличий через 24 часа обнаружено не было.

Экспрессия гена CCR4 в интактных клетках миеломонобластного лейкоза и здоровых доноров не отличается достоверно в течение 60 минут, однако экспрессия гена CCR4 в МНК миеломонобластного лейкоза достоверно увеличивается относительно экспрессии в МНК от здоровых доноров в 9 раз через сутки. Экспрессия гена CCR4 в МНК миеломонобластного лейкоза под действием CXCL12 в 39 раз достоверно выше контроля через 10 минут, достоверных отличий через час не наблюдалось, и достоверно ниже в 5000 раз относительно контроля через 24 часа. Экспрессия гена CCR4 в МНК миеломонобластного лейкоза под действием CXCL12 достоверно выше экспрессии гена CCR4 в МНК здоровых доноров под действием CXCL12 в 4,6 раза на 10 минуте и достоверно не отличается через 60 минут и через сутки.

Достоверных отличий в экспрессии гена EGFR в интактных МНК здоровых доноров, МНК здоровых пациентов под действием CXCL12 и МНК миеломонобластного лейкоза под действием CXCL12 не обнаружено. Экспрессия EGFR в интактных МНК от пациентов с миеломонобластным лейкозом достоверно отличается от контроля в 17 раз на десятой минуте, однако не отличается достоверно от контроля через 60 минут и через сутки.

В качестве исследуемого материала нами был выбран миеломонобластный лейкоз, так как по многочисленным исследованиям именно исход данного онкологического заболевания зависит от пары оси хемокина и рецептора CXCL12-CXCR4 [7]. Для исследования аутоактивации хемотаксиса был выбран самый значимый для данного типа опухоли хемокин — CXCL12, экспрессию гена которого мы исследовали. Также в качестве опосредованно экспрессируемых генов были выбраны EGFR и CCR4, так как по немногочисленным данным известно, что возможно усиление хемотаксиса через ось CXCL12-CXCR4, путем активации CCR4, когда, в свою очередь, активация CXCR4 может значительно повышать экспрессию EGFR, что ведет к активной пролиферации опухоли [7, 8].

Получены данные, что у пациентов с миеломонобластным лейкозом до химиотерапии спонтанная и индуцированная миграция снижена в 7 раз относительно миграции МНК здоровых доноров в течение всего эксперимента. После применения химиотерапии миграционная способность частично восстанавливается. Также показан высокий уровень экспрессии гена CXCL12 в интактных клетках миеломонобластного лейкоза, в то время как под действием хемокина экспрессия достоверно снижалась. Предположительно опухолевые клетки самостоятельно продуцируют CXCL12 в большом количестве, что необходимо для нарушения межклеточных взаимодействий и



Миграция мононуклеарных клеток пациентов с лейкозом до и после проводимой терапии по сравнению с показателями у здоровых доноров.

1 — МНК лейкоз CXCL12, 2 — МНК лейкоз контроль, 3 — МНК здоровые CXCL12, 4 — МНК контроль здоровые, 5 — МНК лейкоз после терапии CXCL12, 6 — МНК контроль после терапии.

дальнейшей интравазии. Стимуляция хемокином CXCL12 достоверно повышала хемотаксис опухолевых клеток после химиотерапии только через час, миграции МНК от пациентов до терапии достоверно не отличалась от контроля, что, скорее всего, обусловлено неотвечаемостью рецепторов вследствие повышенной сенситизации рецептора вследствие аутоактивации выделяемым хемокином и также внешней стимуляции.

Уровень экспрессии CCR4 в опухолевых клетках под действием CXCL12 моментально повышается через 10 минут, что может способствовать активации миграции опухолевых клеток, однако до конца не ясен механизм спонтанной экспрессии CCR4, как и EGFR, в опухолевых клетках через 24 часа. Таким образом, основываясь на исследованиях других ученых и полученных нами данных, можно говорить о том, что хемотаксис опухолевых клеток может происходить без внешней стимуляции путем аутоактивации, которая при определенных условиях может приводить как к гибели клетки, так и к ее распространению в зависимости от стадии опухолевого процесса.

В дальнейшем планируется исследование экспрессии вышеописанных рецепторов в МНК миеломонобластного лейкоза после химиотерапии, а также CXCR4, CXCR7 и TLRs в МНК от здоровых доноров и от пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии по направлению к CXCL12 и TLRs лигандам, что поможет более детально изучить взаимосвязь факторов врожденного иммунитета в онкологических процессах [1,3,4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Лабжинов П.А., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Оценка экспрессии генов компонентов врожденного иммунитета в лейкоцитах мышей при действии синтетических лигандов *in vivo*. Журн. микробиол. 2013, 6:76-80.
2. Свитич О.А., Филина А.Б., Давыдова Н.В., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Роль факторов врожденного иммунитета в процессе опухолеобразования. Медицинская иммунология. 2018, 20(2):151-162.
3. Филина А.Б., Свитич О.А., Аммури Ю.И., Голенков А.К., Клинушкина Е.Ф., Зверев В.В. Изучение миграционной способности мононуклеарных и опухолевых клеток относительно TLRs лигандов и CXCL12. Российский иммунологический журнал. 2017, 11(20): 3:545-547.
4. Филина А.Б., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Лабжинов П.А., Парфенова Т.М., Зверев В.В. Изучение лиганд-опосредованного хемотаксиса клеток макрофагальной линии U937. Медицинская иммунология. 2014, 16(5):443-448.
5. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001, 357:539-545
6. Goede V., Brogelli L., Ziche M., Augustin H.G. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int. J. Cancer*. 1999, 82:765-770.
7. Lazennec G., Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol. Med.* 2010, 16:133-144.
8. Zhang Y., Tian L., Zheng Y.Y. et al. C-terminal peptides of chemokine-like factor 1 signal through chemokine receptor CCR4 to cross-desensitize the CXCR4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, 409:356-361.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.П.Фошина, Т.А.Серова, И.В.Бишева, О.В.Слатинова

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОВАК ВП-4 В ОТНОШЕНИИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ЧАСТО И ДЛИТЕЛЬНО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Изучить уровень специфических антител различных изотипов к антигенам *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* в сыворотке, слюне и назальном секрете у часто и длительно болеющих детей (ЧДБД), а также концентрацию IgA, sIgA, IgG в слюне при назально-оральном введении Иммуновак ВП-4. **Материалы и методы.** Специфические антитела к *S.aureus* и *K.pneumoniae*, содержащиеся в слюне, назальном секрете и сыворотке крови, определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, концентрации иммуноглобулинов классов G, A и sA в слюне — методом радиальной иммунодиффузии с использованием коммерческого набора,

выпущенного НПЦ «Медицинская иммунология». *Результаты.* Высокий уровень специфических антител содержится в сыворотке и назальном секрете, уровень АТ в слюне незначителен. В сыворотке преобладают АТ IgG-изотипа, в слюне и назальном секрете — IgA-изотипа. После введения Имуновак ВП-4 происходило статистически значимое повышение уровня специфических антибактериальных антител в сыворотке, слюне и назальном секрете и нарастание уровня IgG и sIgA в слюне. *Заключение.* Полученные данные свидетельствуют о том, что назально-оральная схема введения Имуновак ВП-4 ЧДБД позволила повысить уровень специфических антител в сыворотке, слюне и назальном секрете к бактериальным антигенам, входящим в состав вакцины, и нормализовать местный синтез IgG и sIgA, осуществляющих основную роль в защите респираторного тракта и слизистых верхних дыхательных путей.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 104—110

Ключевые слова: часто и длительно болеющие дети, специфические антитела, антитела IgA-изотипа, бактериальные иммуномодуляторы, мукозальный иммунитет

E.P.Foshina, T.A.Serova, I.B.Bisheva, O.V.Slatinova

THE EFFECTIVENESS OF IMMUNOVAC VP-4 FOR IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN FREQUENTLY AND LONG-TERM ILL CHILDREN

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. To study the level of specific antibodies of different isotypes to the antigens of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in the serum, saliva and nasal secret and the concentration of IgA, sIgA, IgG in saliva from frequently and long-term ill children in nasal-oral administration of Immunovac VP-4. *Materials and methods.* Specific antibodies to *S. aureus* and *K. pneumoniae*, contained in saliva, nasal, and serum were determined by the method of enzyme immunoassay. Concentrations of immunoglobulins of classes G, A and sA in saliva were determined by radial immunodiffusion using a commercial kit produced by the NPC «Medical immunology». *Results.* The high level of specific antibodies contained in the serum and nasal secretions, the level of antibodies in saliva is negligible. The serum is dominated by IgG-isotype antibodies, saliva and nasal secret — antibodies of IgA-isotope. After the introduction of Immunovac VP-4 there was a statistically significant increase in the level of specific antibacterial antibodies in serum, saliva and nasal secret, and increasing levels of IgG and sIgA in saliva. *Conclusion.* Obtained data demonstrate that the nasal-oral scheme of administration of Immunovac VP-4 frequently and long-term ill children allowed to increase the level of specific antibodies in serum, saliva and nasal secret to bacterial antigens that are part of the vaccine and to normalize the local synthesis of IgG and sIgA, which play a major role in the protection of the respiratory tract and mucous membranes of the upper respiratory tract.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 104—110

Key words: frequently and long-term ill children, specific antibodies, IgA-isotype antibodies, bacterial immunomodulators, mucosal immunity

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем клинической иммунологии является коррекция иммунологических нарушений у длительно и часто болеющих детей (ЧДБД) [5]. Частота эпизодов острых респираторных инфекций у ЧДБД (6-8 и более раз в год) объясняется физиологической незрелостью иммунной системы — количественным и функциональным дефицитом Т-лимфоцитов, изменением синтеза цитокинов, временным дефицитом IgG, частичным дефицитом IgA, дефицитом гранулоцитарного хемотаксиса и антимикробной активности и др. [1, 3]. Чтобы скорректировать имеющиеся у ЧДБД иммунные нарушения, применяется широкая группа иммуотропных препаратов. Среди них важное место занимают иммуномодуляторы бактериального происхождения, содержащие в своем составе лизаты и компоненты клеточных структур основных условно патогенных микроорганизмов, являющихся возбудителями респираторных инфекций. Клинический эффект бактериальных иммуномодуляторов направлен на снижение числа и тяжести обострений респираторных инфекций [9]. Отличительной

особенностью бактериальных иммуномодуляторов является их способность обладать одновременно иммуномодулирующим и вакцинальным эффектами. В эту группу относятся импортные препараты БронхоВаксом, Бронхомунал, ИРС-19, Рибомунил, Имудон, Исмиген, Субреум (капсулированный лизат 18 штаммов *Escherichia coli*) и др. Все эти вакцины содержат порядка 7 — 19 компонентов, что предполагает обеспечение ими протективного эффекта путем формирования антител многих специфичностей. Хотя они и не вызывают длительного и стойкого протективного иммунитета, но все же стимулируют специфический антимикробный иммунитет, повышают активность макрофагов, содержание лизоцима и секреторного IgA [7, 8].

Бактериальные иммуномодуляторы делятся на две группы: системного действия (БронхоВаксом, Бронхомунал, Ликопид, Исмиген) и преимущественно топического действия (ИРС-19, Имудон, Ликопид). Одним из представителей бактериальных вакцин отечественного производства является Иммуновак ВП-4, созданная в НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова. Иммуновак-ВП-4 включает в себя лизаты четырех условно патогенных микроорганизмов — *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*. Расширение спектра действия препарата в отношении различных этиологически значимых микроорганизмов в этом случае достигалось не за счет увеличения числа компонентов, а за счет подбора антигенов, обеспечивающих широкий спектр перекрестных реакций с наиболее часто встречающимися патогенными представителями микрофлоры бронхолегочного тракта и обладающих иммуномодулирующими свойствами.

ВП-4 индуцирует продукцию специфических антител к микробным компонентам комплекса, активирует гранулоцитарно-макрофагальное звено иммунитета, способствует увеличению численности Т-лимфоцитов, стимулирует синтез IgG, IgA, sIgA, повышает уровень интерлейкина-2 и интерферона; применяется для лечения воспалительных и обструктивных заболеваний органов дыхания, включая детей от 3 лет [2]. Высокий терапевтический эффект Иммуновак ВП-4 обусловлен активацией врожденного иммунитета через оптимальное сочетание природных агонистов Tol-like рецепторов в виде липополисахаридов, пептидогликанов, тейхоевых кислот, белковых антигенов клеточных стенок[4]. С целью повышения эффективности терапии Иммуновак ВП-4 и выбора критерия эффективности ее применения необходимо оценить специфический иммунный ответ к бактериальным антигенам, входящим в состав вакцины, как в сыворотке, так и в слюне и назальном секрете. Это особенно важно для вакцин, применяющихся местно — перорально и интраназально, так как в этом случае в процесс формирования поствакцинального ответа активно вовлекаются факторы местной иммунологической системы. Так как секреторная иммунологическая система слизистых является одним из важнейших звеньев иммунной системы организма, наравне с компонентами системного иммунитета, обеспечивающая защиту от инфекционных агентов, факторы местного иммунитета играют значительную роль в патогенезе и протекании многих заболеваний, особенно респираторного тракта. При этом уровень специфических иммуноглобулинов в слюне и назальном секрете может служить высокоинформативным диагностическим и прогностическим признаком. Опубликовано большое количество статей, посвященных различным аспектам влияния Иммуновак ВП-4 на параметры клеточного и гуморального иммунитета, однако влияние поликомпонентной вакцины на мукозальный иммунитет изучено недостаточно. Исходя из этого, цель работы — изучение динамики показателей мукозального иммунитета (специфических антител различных изотипов к антигенам *S.aureus* и *K.pneumoniae*) в сыворотке, слюне и назальном секрете и IgG, IgA, sIgA в слюне у больных ЧДБД при назально-оральном введении поликомпонентной вакцины Иммуновак ВП-4 [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами было обследована группа, состоящая из 21 пациента, отнесенных к категории часто и длительно болеющих детей, обратившихся в консультативно-поликлиническое отделение НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова в возрасте от 5 до 11 лет. Из исследования исключались больные с наличием аллергопатологии, неврологических отклонений. Поликомпонентная вакцина вводилась детям со-

гласно инструкции по применению препарата назально-оральным способом. Курс включал в себя три назальных и 6-8 пероральных введений препарата с интервалом 3-4 дня. Иммунологическое обследование проводилось до введения вакцины и через 0,5-1,5 месяца после окончания терапии. У пациентов производили сбор венозной крови, слюны и назального секрета. Для оценки уровня специфических антител G и A изотипа в слюне нами использовалась общая нестимулированная слюна. Сбор смешанной нестимулированной слюны (1-2 мл) проводился не менее чем через два часа после еды. Собранный материал охлаждался при $+4^{\circ}\text{C}$ для снижения активности пищеварительных ферментов и центрифугировался в течении 20 минут при 1500 g для удаления посторонних включений. Надосадочную жидкость собирали в пробирки и хранили при -20°C до момента постановки реакции. Сбор назального секрета проводили следующим образом: в средний носовой проход каждой половины полости носа помещали на 10 минут стандартные ватные палочки, предварительно взвешенные в стерильных пластмассовых чашках Петри диаметром 40 мм. В процессе сбора назального секрета время от времени массировали крылья носа. После окончания процедуры сбора палочки снова помещались в чашки Петри, повторно взвешивались для определения массы полученного назального секрета и хранились при -20°C до момента постановки реакции. Антитела определяли методом твердофазного ИФА с помощью моноклональных антител против соответствующих классов иммуноглобулинов (производства ООО «Полигност») и выражали величиной обратного титра, при котором значение оптической плотности равнялось 0,3.

Определение концентрации иммуноглобулинов классов G, A и секреторного A проводили с использованием коммерческого набора, выпущенного НПЦ «Медицинская иммунология». Набор представляет собой готовую систему для постановки РИД по Манчини в модификации Е.В. Черныхвостовой. Согласно многочисленным методическим рекомендациям по работе с биологическими секретами в тест-системе использовано три типа моноспецифических сывороток: против IgG человека, против α -цепи IgA молекулы и против секреторного компонента. Таким образом, по количеству IgA, определяемому в реакции с антисывороткой к α -цепи IgA-молекулы, мы судили об общем уровне IgA в слюне, а при определении иммуноглобулинов с антисывороткой к секреторному компоненту мы определяли суммарное содержание sIgA и свободного секреторного компонента. По разности этих двух величин мы могли оценить порядковую величину содержания свободного секреторного компонента в образце слюны. Постановку реакции проводили в соответствии с инструкцией, прилагаемой к наборам.

Оценка результатов проводилась с использованием стандартных методов статистического анализа (пакет прикладных программ Статистика 6.1) с учетом характера распределения признаков. При отсутствии нормального распределения или при неизвестном его типе для описания характера распределения вычисляли медианы и интерквартильный размах (25 и 75 процентиля). Достоверность различий между исследуемыми группами оценивали с помощью метода Манна-Уитни. Для проверки достоверности различий признаков внутри групп до и после лечения применяли критерий Вилкоксона для парных сравнений. Связь признаков оценивали непараметрическим методом ранговой корреляции (ρ) по Спирмену-Вилкоксону. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по содержанию антибактериальных антител в сыворотке, слюне и назальном секрете ЧДБД приведены в табл. 1. Было установлено, что уровень бактериальных специфических антител колебался в различных диапазонах в зависимости как от природы антигена, так и от вида исследуемого биоматериала. Титры антител всех трех изотипов к *S. aureus* в исследуемых биопрепаратах — сыворотке, слюне и назальном секрете, были на порядок выше, чем к *K. pneumoniae*. При этом в сыворотке крови титры специфических бактериальных антител G-изотипа более, чем в 10 раз, превышали соответствующие титры A-изотипа, а титры антител M-изотипа были более, чем в 10 раз, ниже титров A изотипа.

Таблица 1. Динамика бактериальных антител у ЧБД в процессе лечения Иммуновак ВП-4

Био материал	Антиген	Изотип антител	Обратные титры антител Ме (25%-75%)	
			До введения вакцины	Через 1 мес. после завершения курса
Сыворотка	S.aureus	IgA	715,0 (380,5-1136,5)	1358,5 (371,5-1817,5)* p=0,028
		IgG	11904,0 (3629,0-15458,0)	11644,5 (3496,0-19261,0)
	K.pneumoniae	IgM	117,5 (14,0-193,0)	69,5 (7,0-150,0)* p=0,026
		IgA	26,0 (17,0-66,0)	56,0 (28,0-76,0)* p=0,012
		IgG	112,0 (53,0-287,0)	175,0 (97,0-591,0)* p=0,014
Слюна	S.aureus	IgM	8,0 (2,5-25,0)	9,0 (5,0-16,0)
		IgA	15,0 (6,0-63,5)	30,5 (13,5-57,5)* p=0,028
	K.pneumoniae	IgG	2,0 (1,0-8,0)	3,0 (1,0-14,0)
		IgA	4,0 (1,0-10,0)	7,0 (1,0-20,0)* p=0,026
		IgG	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)
Назальный секрет	S.aureus	IgA	648,0 (187,0-2142,0)	938,0 (312,0-2540,0)* p=0,042
	K.pneumoniae	IgG	400,5 (104,0-1594,0)	370,5 (75,0-11961,0)
		IgA	86,0 (20,0-160,0)	104,0 (55,0-439,0)* p=0,012
		IgG	20,0 (20,0-71,0)	20,0 (20,0-79,0)

Примечание. * Показатели, достоверно отличающиеся от исходного уровня.

Уровень исследуемых бактериальных антител в сыворотке был наивысшим по сравнению с их уровнем в назальном секрете и слюне. Так, величина обратных титров антител G-изотипа в сыворотке могла быть более 100 000, А-изотипа — более 20 000, причем значения уровня специфических антител А-изотипа в сыворотке и назальном секрете были одного порядка, а G-изотипа в сыворотке превышал на порядок данный показатель в назальном секрете. Самым низким был показатель уровня бактериальных антител в слюне — его медиана обратных титров в исследуемых группах не превышала 100.

Проводя анализ динамики изучаемых параметров в результате применения Иммуновак ВП-4 мы отметили статистически достоверное повышение уровня IgA к обоим антигенам, причем почти в 2 раза, повышение уровня IgG к K. pneumoniae и понижение уровня стафилококковых IgM. Уровень стафилококковых IgG в сыворотке у детей до Ме 11904,0 (3629,0—15458,0) и после вакцинации — Ме 11644,5 (3496,0—19261,0) практически не изменялся. Назально-оральное введение

ВП-4 приводило к усилению локального синтеза специфических иммуноглобулинов. Происходило достоверно значимое повышение уровня IgA как к *S. aureus*, так и к *K. pneumoniae*, уровень антител G-изотипа в назальном секрете достоверно не изменялся. Обратные титры антител A изотипа к обоим исследуемым антигенам статистически достоверно повышались у детей после вакцинации. Однако следует отметить, что это повышение от изначального уровня для стафилококковых антител ($Me=15,0$) до поствакцинального ($Me=31,5$) было более чем в 2 раза, а для антител данного изотипа к *K. pneumoniae* — в 1,75 раза. Изменение уровня антител G изотипа к обоим антигенам в слюне в процессе вакцинации не носило достоверного характера.

Таким образом, комбинированная назально-оральная схема введения ВП-4 через 0,5-1,5 месяца приводит к статистически достоверному повышению в сыворотке, слюне и назальном секрете уровня IgA как к *S. aureus*, так и к *K. pneumoniae* и понижению уровня стафилококковых IgM в сыворотке. Можно также утверждать, что уровень специфических антител IgA изотипа к различным инфекционным агентам может служить не только критерием неинвазивной диагностики данного инфекционного процесса и состояния иммунной недостаточности организма, но и применяться для оценки эффективности вакцинации.

В рамках нашего исследования ЧДБД были представлены двумя подгруппами. В первую подгруппу были отнесены пациенты с частыми эпизодами ОРВИ, как правило, с пиком заболеваемости в осенне-зимний период, без каких-либо системных заболеваний. Во вторую подгруппу вошли также часто болеющие дети, но с хроническими ЛОР-заболеваниями, такими как гнойные синуситы, рецидивирующие отиты, хронический тонзиллит.

Были выявлены изменения в показателях мукозального гуморального иммунитета у ЧДБД, различия по отношению к условно здоровым детям и между подгруппами. Так, около 67% обследуемых нами часто болеющих детей первой подгруппы в период ремиссии имели низкий уровень sIgA в слюне, который статистически значимо отличался от показателя практически здоровых детей ($p<0,01$) (табл. 2). У 27% детей этой группы параллельно можно было наблюдать снижение уровня общего IgA в слюне. В 23% случаев было выявлено повышение концентрации IgG в слюне. Следует отметить, что все три показателя в пределах нормы были зафиксированы только у 13% пациентов этой группы. Для ЧДБД с хронической ЛОР-патологией снижение sIgA не было характерным, в отличие от детей первой подгруппы. Такое снижение было выявлено только в двух случаях (4% от числа обследованных). При этом значительно большее число пациентов (34%) имели сниженный уровень IgA в слюне. В 20% случаев регистрировались высокие значения иммуноглобулина, определяемого с анти-сывороткой к секреторному компоненту. Такое соотношение показателей позволило нам предположить, что для представителей этой подгруппы, скорее всего, было свойственно наличие свободного секреторного компонента в высоких концентрациях. Также как и в первой подгруппе, около 20% ЧДБД с хронической ЛОР-патологией имели повышенный уровень IgG в слюне.

Таблица 2. Уровень иммуноглобулинов в слюне часто болеющих детей (n=13) до и после вакцинотерапии ВП-4

Сроки обследования	Концентрация иммуноглобулинов ($\cdot 10^{-3}$ г/л)					
	IgG		IgA		sIgA	
	Ср. значение	Дов. интервал	Ср. значение	Дов. интервал	Ср. значение	Дов. интервал
До вакцинации (n=13)	20,25	14,96-25,54	28,46	16,26-40,66	84,60	24,80-144,40
В течение 1 месяца после лечения (n=8)	35,60*	21,73-49,47	62,57	26,87-98,27	329,67*	160,94-498,40
Через 1 — 1,5 месяца (n=10)	45,20	5,02-85,38	37,00	22,82-51,18	112,25	72,86-152,34

Примечание. *значения показателей, достоверно ($p<0,05$) отличающиеся от своего исходного уровня.

В результате проведенного курса лечения ВП-4 уже через две недели после последнего приема препарата было отмечено статистически значимое нарастание уровня IgG и sIgA ($p < 0,05$) (табл. 2). При последующем обследовании уровень IgG в слюне сохранял тенденцию к повышению, хотя отличие величины этого показателя через 1 — 1,5 месяца после лечения от исходного уровня уже не было статистически достоверным.

Уровень sIgA в слюне ЧДБД после вакцинотерапии ВП-4 достигает максимального уровня примерно через 1 месяц после окончания курса лечения, причем концентрация иммуноглобулина этого класса возрастает практически в четыре раза. В дальнейшем, через 1 — 1,5 месяца, происходит снижение количества sIgA в слюне, и его уровень становится вполне сопоставимым с исходными величинами.

В отношении IgA была отмечена тенденция к увеличению его концентрации в слюне. При этом следует отметить, что исходно среднее значение этого показателя по группе было несколько ниже возрастной нормы. Максимального значения концентрация IgA достигает через 1 месяц после окончания курса вакцинотерапии ВП-4. Через 1 — 1,5 месяца уровень IgA в слюне снижается, однако среднее значение находится в пределах границ возрастной нормы, в отличие от исходного значения.

У ЧДБД без локальных очагов инфекции респираторного тракта имеет место выраженное снижение sIgA в слюне, которое в ряде случаев сопровождается параллельным снижением IgA в слюне. Такая картина, на наш взгляд, говорит о низкой иммунологической реактивности слизистой верхних дыхательных путей у детей с частыми эпизодами о респираторной инфекции.

В отличие от представителей этой подгруппы, ЧДБД с хроническими ЛОР-заболеваниями характеризуются сниженным уровнем IgA в слюне, но не sIgA. Таким образом, ЧДБД, имеющие различные клинические особенности, достаточно ярко различаются по характеру изменений в уровнях иммуноглобулинов слюны, что может быть использовано в качестве дополнительного диагностического признака. Вакцинотерапия ВП-4 позволила нормализовать уровень иммуноглобулинов в слюне у ЧДБД. Было отмечено нарастание IgG и sIgA в слюне, что свидетельствует о повышении локальной иммунологической реактивности носоглотки. Антигенные составляющие поликомпонентной вакцины индуцировали местный синтез IgG и sIgA, осуществляющих основную роль в защите респираторного тракта и слизистых верхних дыхательных путей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева А.А., Намазова-Баранова Л.С., Торшхоева Р.М., Вишнева Е.А., Левина Ю.Г. Иммунокоррекция в комплексной терапии часто болеющих детей. Практика педиатра. 2011, 6:5-9.
2. Балаболкин И.И., Булгакова В.А., Краснопрошина Л.И., Курбатова Е.А. Опыт применения вакцины Иммуновак ВП-4 при бронхиальной астме у детей. Педиатрия. 2007, 86 (6):86-89.
3. Заплатников А.Л., Гирина А.А. К проблеме «часто болеющих детей». Педиатрия. 2015, 94(4):215-221.
4. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А. Иммунотерапевтическая концепция использования микробных антигенов при атопии и патологии, ассоциированной с условно-патогенной микрофлорой (на примере поликомпонентной вакцины Иммуновак-ВП-4). Медицинская иммунология. 2008, 10(1):13-20.
5. Караулов А.В. Иммуномодуляторы: от прошлого к будущему. Эффективная фармакотерапия. 2013, 27:4-5.
6. Краснопрошина Л.И., Серова Т.А., Фошина Е.П., Бишева И.В., Сходова С.А. Особенности иммунного ответа при пазличных схемах применения бактериальной терапевтической вакцины Иммуновак ВП-4. Журн. микробиол. 2017, 4:23-30.
7. Маркова Т.П., Ярилина Л.Г., Чувиров Д.Г., Чувирова А.Г., Ким М.Н. Бактериальные лизаты в педиатрии. Педиатрия. 2016, 95(5):91-98.
8. Слатинова О.В. Динамика показателей системного и местного иммунитета у пациентов с бронхолегочными заболеваниями при применении поликомпонентной вакцины (ВП-4). Автореф. дисс. канд.биол.наук. М., 2000.
9. Чувиров Д.Г., Маркова Т.П. Вирусно-бактериальные респираторные инфекции. Профилактика и лечение. РМЖ. 2015, 14:839-843.

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВ ГЕМОФИЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Изучение иммунобиологической активности комплексного препарата, предназначенного для профилактики гемофильной инфекции. **Материалы и методы.** В работе использованы комплексный препарат, содержащий 1 мкг липоолигосахарида (ЛОС) и 10 мкг белоксодержащей фракции (БСФ), а также монопрепараты ЛОС, БСФ и препарат капсульного полисахарида. Для изучения протективной активности комплексного препарата аутобредным мышам массой 14–16 г вводили однократно внутримышечно 0,5 мл (доза) препарата. Через 10 дней животных заражали живыми культурами *Haemophilus influenzae* капсульного и бескапсульных штаммов в дозе 5×10^9 микр.кл./мышь. Уровень специфических антител у иммунизированных животных выявляли в непрямом варианте ИФА. Для изучения влияния комплексного препарата на развитие инфекционного процесса иммунизированных мышей интраназально заражали культурами капсульного и нетипируемого штаммов *H. influenzae*. Вскрытие животных проводили через 3, 24, 48 и 72 часа. Стерильно отобранный материал (ткань легкого) гомогенизировали, титровали, мерно высевали на чашки Петри и через 18–20 часов культивирования производили подсчет выросших колоний бактерий, после чего пересчитывали число бактерий на мышь. **Результаты.** Исследования показали, что комплексный препарат обеспечивал защиту 90–100% животных от штаммов возбудителя, использованных в опыте. Иммунизация мышей препаратом приводила к значимому увеличению уровня специфических антител, выявляемых в непрямом варианте ИФА. При интраназальном заражении в контрольной группе, начиная с третьих суток, наблюдалось размножение возбудителя в легких. При этом у иммунизированных мышей количество бактерий, высеваемых из ткани легких, было незначительным в те же сроки наблюдения. Практически у всех мышей контрольной группы возбудитель выделяли из лимфатических узлов, брыжейки, у иммунных мышей этот показатель был значимо ниже. **Заключение.** Комплексный препарат защищал животных от всех заражающих штаммов возбудителя. Динамика формирования инфекционного процесса напрямую зависела от развития иммунного ответа на введение комплексного препарата.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 111–115

Ключевые слова: гемофильная инфекция, комплексный препарат, перекрестная протективная активность, капсульный и бескапсульные штаммы

Н.Е.Yastrebova, М.М.Tokarskaya, S.I.Elkina, N.N.Ovechko, S.A.Baranovskaya

THE IMMUNOBIOLOGICAL ACTIVITY OF THE COMPLEX PREPARATION AGAINST *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* INFECTION

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. To study the immunobiological activity of the complex preparation for *Haemophilus influenzae* infections prevention. **Materials and methods.** We used the complex preparation, containing 1 mcg of lipooligosaccharide and 10 mcg of protein-containing fraction, lipooligosaccharide and protein-containing fraction monopreparations, and capsular polysaccharide preparation. For studying cross-protective activity of the complex preparation white outbred mice (weight 14–16 g) were intramuscularly immunized with a dose 0,5 ml. 10 days later the animals were inoculated with *H. influenzae* encapsulated and non-typed strains culture inoculum in a dose 5×10^9 microbial cells/mouse. The immunized animals specific antibodies level was determined by means of indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For studying complex preparation's influence on the development of the infectious process immunized mice were intranasally inoculated with *H. influenzae* encapsulated and non-encapsulated strains. The mice dissections were performed in 3, 24 and 72 hours after inoculation. Sterile samples (lung tissue) were homogenized, titrated and plated onto 5% horse blood agar; then after 18–20 growth hours we counted the number of colonies and recalculated its number for one mouse. **Results.** Our investigations have shown that the complex preparation provided 90–100% animals' defence from used in this experiment infectious agent strains. Mice immunization with the preparation induced significant increase in the level of antibodies, revealed by means of indirect ELISA. Beginning with the third day after intranasal inoculation there was a pathogen multiplica-

tion in control group mice lungs. In the same time immunized mice had almost undetectable number of bacteria. Almost all animals from control group contained pathogen in lymph nodes and mesentery; though pathogen's presence in immune mice viscera was rather occasional. *Conclusion.* The complex preparation protected animals from all *H. influenzae* strains, used in our experiment. The dynamic of the infectious process directly depended on the development of immune response on the complex preparation injection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 111–115

Key words: *Haemophilus influenzae* infections, complex preparation, cross-protective activity, encapsulated and non-encapsulated strains

ВВЕДЕНИЕ

Фактические данные, накопленные в последние годы, свидетельствуют о том, что инфекции, вызываемые *H. influenzae*, имеют широкое распространение на территории России и являются актуальной проблемой здравоохранения [4]. Для профилактики инфекций, вызываемых капсульными штаммами (Hib), применяется конъюгированная вакцина Акт-ХИБ (Авентис Пастер, Франция). Для профилактики инфекций, вызываемых бескапсульными штаммами (NTHi), вакцины не существует. Между тем, распространенность, частота генерализации, тяжесть течения заболеваний и высокая летальность при инфекциях, обусловленных штаммами *H. influenzae*, принадлежащими к разным серотипам, требует разработки именно такой вакцины для специфической профилактики [8].

Описаны исследования, авторы которых химическим способом конъюгировали относительно консервативные детоксицированные липоолигосахариды с белками для формирования вакцин [7]. Эти конъюгаты были иммуногенны для мышей и кроликов и вызывали Т-зависимую иммунологическую защиту. Для создания нового вакцинного препарата, направленного на профилактику гемофильной инфекции, вызываемой как капсульными, так и бескапсульными штаммами *H. influenzae*, могут быть использованы липоолигосахариды, препараты, содержащие белки наружной мембраны, а также комбинация некоторых из них [5]. Основываясь на ранее проведенных исследованиях, в НИИВС им. И.И. Мечникова проведена НИР по разработке комплексного препарата, предназначенного для профилактики гемофильной инфекции. Целью настоящего исследования явилось изучение иммунобиологической активности разработанного препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы комплексный препарат, содержащий 1 мкг липоолигосахарида (ЛОС) и 10 мкг белоксодержащей фракции (БСФ), а также монопрепараты ЛОС, БСФ и препарат капсульного полисахарида (КПС). Препарат ЛОС получали экстракцией раствором хлорида натрия [1]. По данным субтипирования ЛОС принадлежит к наиболее распространенному бескапсульному штамму (№45 NTHi). Белоксодержащую фракцию получали методом водной экстракции (БСФ-ВЭ) [3]. Метод экстракции дополняли этапом очистки от нуклеиновых кислот с последующим диализом и очисткой от низкомолекулярных примесей гелевой фильтрацией. Капсульный полисахарид *H. influenzae* получали из культуральной жидкости экстракцией цетавлоном. Все препараты получены из микробных культур штаммов-продуцентов *H. influenzae* в лаборатории иммунохимической диагностики НИИВС им. И.И. Мечникова. Монопрепараты использовали как препараты сравнения.

Для изучения протективной активности комплексного препарата аутобредным мышам массой 14–16 г вводили однократно внутримышечно 0,5 мл (доза) препарата. Через 10 дней животных заражали живыми культурами *H. influenzae* капсульного (№1095) и бескапсульных штаммов (№45, №58, №65) в дозе 5×10^9 микр.кл./мышь. Наблюдение за животными проводили в течение 7 дней, регистрируя смертность.

Уровень специфических антител у иммунизированных животных выявляли в непрямом варианте ИФА. В качестве отрицательного контроля использовали сыровотки интактных животных.

Для изучения влияния комплексного препарата на развитие инфекционного процесса иммунизированных мышей интраназально заражали культурами капсультного и бескапсультного штаммов *H.influenzae* [6]. Контрольной группе вводили физиологический раствор. Вскрытие животных проводили через 3, 24, 48 и 72 часа. Стерильно отобранный материал (ткань легкого) гомогенизировали, титровали и мерно высевали на чашки Петри с сердечно-мозговым агаром с добавлением 5% крови и через 18-20 часов культивирования в термостате при температуре 36,5 °C и 5% CO₂ производили подсчет выросших колоний бактерий, после чего пересчитывали число бактерий на мышь.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что комплексный препарат обеспечивал защиту 90-100% животных от штаммов возбудителя, использованных в опыте. ЛОС NTHi 45 также обладал достаточно высокой перекрестной протективной активностью и в дозе 1 мкг защищал от заражения капсультным и бескапсультными штаммами (табл. 1). Добавление ЛОС к КПС стимулировало аналогичный уровень защиты (80-100%), в то время как введение мышам КПС создавало защиту только к капсультному Nib штамму. Белковый монокомпонент в дозе 10 мкг обладал меньшим протективным эффектом и защищал 50-60% мышей. Неожиданным обстоятельством явилось торможение протективных свойств варианта препарата, состоящего из белкового компонента и КПС Nib. Его протективная активность в отношении штамма Nib снижалась до 20-40% В отношении бескапсультных штаммов этот эффект был менее выраженным, но тоже достоверным (p<0,05).

Иммунизация мышей комплексным препаратом приводила к значимому увеличению уровня специфических антител, выявляемых в непрямом варианте ИФА (табл. 2). При иммунизации животных препаратами сравнения увеличение титров специфических антител зависело от использованного препарата. Высокий уровень IgG к ЛОС наблюдался при иммунизации ЛОС и исходной фракцией БСФ-ВЭ, что свидетельствовало о присутствии в последнем примеси липоолигосахарида. Иммунизация мышей БСФ-ВЭ приводила к образованию высокого уровня антител

Таблица 1. Протективная активность комплексного препарата

№ гр.	Препарат	Доза (мкг/мышь)	% выживших животных при заражении:			
			Nib 1095	NTHi 45	NTHi 58	NTHi 65
1	Комплексный препарат	10,0+1,0	90,0	100,0	100,0	100,0
2	ЛОС 45 NTHi	1,0	60,0	100,0	100,0	100,0
3	БСФ-ВЭ-45-3	10,0	60,0	60,0	50,0	60,0
4	КПС Nib	10,0	100,0	0	0	0
5	КПС+ЛОС	10,0+1,0	100,0	80,0	80,0	80,0
6	БСФ-ВЭ-45 3+КПС	10,0+10,0	20,0	40,0	30,0	30,0

Таблица 2. Уровень IgG к антигенам *H.influenzae* после иммунизации мышей комплексным препаратом и препаратами сравнения

№гр.	Препарат	Доза (мкг/мышь)	ОП 1:100 ИФА с иммуносорбентом		
			КПС Nib	ЛОС 45	БСП-ВЭ-45
1	Комплексный препарат	10,0+1,0	0,34	2,60	2,26
2	ЛОС 45 NTHi	1,0	0,26	1,94	1,18
3	БСФ-ВЭ	10,0	0,34	2,11	2,39
4	КПС Nib	10,0	0,35	0,24	0,13
5	КПС+ЛОС	10,0+1,0	0,34	1,81	1,32
6	БСФ-ВЭ+КПС	10,0+10,0	0,33	1,63	2,18
7	Интакт.мыши	-	0,30	0,33	0,31
8	Фон (б/сыв)	-	0,10	0,11	0,18

к ЛОС и БСФ-ВЭ. При этом уровень IgG к препарату БСФ был самым высоким. Высоким был уровень IgG к ЛОС при иммунизации животных смесью БСФ и ЛОС (ОП=2,6).

Развитие инфекционного процесса, контролируемого по высевам бактерий из внутренних органов животных, протекало по-разному в контрольной и опытных группах (рис. 1, 2). В контрольной группе, начиная с третьих суток, наблюдалось размножение возбудителя в легких. При этом у иммунизированных мышей количество бактерий, высеваемых из ткани легких, было незначительным в те же сроки наблюдения. Параллельно с высевами из легких, бактерии высевали из других органов (сердце, селезенка, печень, почки, лимфатические узлы брыжейки) Индекс обсемененности уже через три часа после заражения достигал единицы. Спустя 72 часа после заражения культурой штамма Hib 1095 обсемененность органов в опытных группах мышей резко снижалась, по сравнению с контролем; при заражении штаммом NTNi 45 возбудитель у опытных мышей не высевался. Через 144 часа наблюдения в органах мышей вновь обнаружен возбудитель в половине проб. Индекс обсемененности находился в пределах от 0,3 до 0,4. Практически у всех мышей контрольной группы возбудитель выделялся из лимфатических узлов, брыжейки, у иммунных мышей этот показатель был значимо ниже.

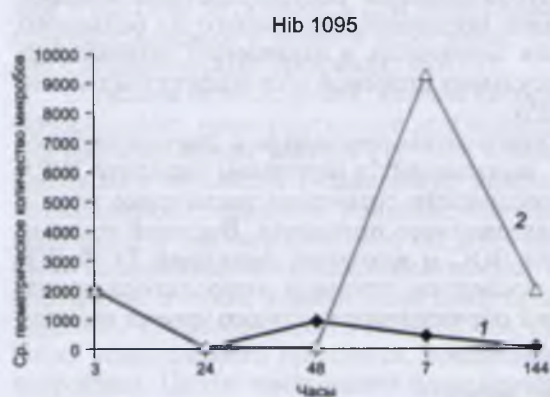


Рис. 1. Зависимость количества микробов в легких от времени наблюдения при заражении капсульным штаммом 1095.

1 — препарат, 2 — контроль.

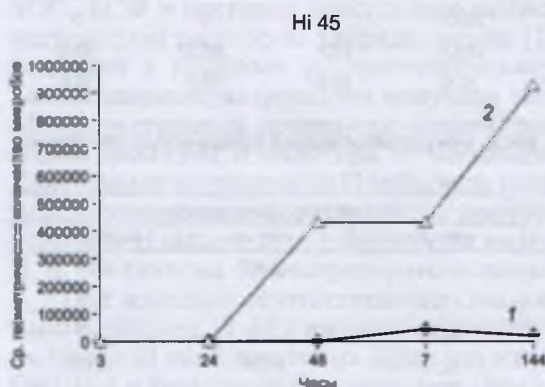


Рис. 2. Зависимость количества микробов в легких от времени наблюдения при заражении бескапсульным штаммом №45.

1 — препарат, 2 — контроль.

Инфекции, вызываемые *H. influenzae*, являются важной причиной заболеваемости и смертности в экономически развитых и развивающихся странах, прежде всего, среди детей раннего возраста. Учитывая распространенность и тяжелое течение инфекций, вызываемых наиболее вирулентным капсульным серотипом — Hib, нельзя недооценивать медико-социальную значимость заболеваний, вызываемых бескапсульными штаммами гемофильной палочки. Основными факторами патогенности таких штаммов являются белки наружной мембраны и ЛПС. Следует отметить, что штаммы не содержат полноценного липополисахарида, а содержат липоолигосахарид (ЛОС), лишенный длинных S-специфических цепей. При этом липоолигосахарид имеет уникальную структуру, и среди бескапсульных штаммов обнаружено более 10 различающихся по специфичности липоолигосахаридов. Поэтому сахарид-производные препараты для профилактики гемофильной инфекции должны содержать множество углеводных структур, чтобы обеспечить адекватный охват штаммов, вызывающих инфекции. Вакцина, направленная на поверхностно-представленные ЛОС, может быть возможным кандидатом для контроля NTNi инфекций. Однако детоксицированный ЛОС является Т-независимой молекулой, слабо иммуногенной *in vivo*. Вдобавок к слабой иммуногенности ЛОС гетерогенность олигосахаридов и гомология между углеводными структурами на по-

верхности бактериальных клеток и клеточных мембранах макроорганизма делает разработку NTHi-вакцин нелегким заданием. За рубежом разрабатываются вакцинные препараты на основе видовых белков наружной мембраны (БНМ) и ЛОС. Все разрабатываемые препараты относятся к типу конъюгированных вакцин, обладающих свойствами Т-зависимого антигена. На основании данных субтипирования нами выбран наиболее распространенный в популяции бескапсульный штамм *H.influenzae* — №45 NTHi [2]. ЛОС 45NTHi обладал наиболее выраженной специфической и перекрестной активностью. Кроме того, методом водной экстракции нами получены белоксодержащие фракции (БСФ). Его производный — БСФ-ВЭ-3 хроматографически очищенный препарат обладал перекрестной серологической активностью, содержал в своем составе известные протективные белки наружной мембраны *H.influenzae* (P₂, P₃, P₆) и обладал низкой токсичностью (LD₅₀~2,0 мкг). Препарат ЛОС защищал мышей от заражения летальными дозами гетерологичных бескапсульных штаммов. Добавление ЛОС к КПС стимулировало защиту (80-100%) от заражения капсульным и бескапсульными штаммами, в то время как введение мышам КПС создавало защиту только к капсульному Hib штамму. БСФ-ВЭ в дозе 10 мкг обладает протективным эффектом, защищая 50-60% мышей от заражения капсульным и бескапсульными штаммами *H.influenzae*. Изучение гуморального ответа на введение комплексного препарата и препаратов сравнения позволило прийти к заключению о том, что КПС Hib не стимулирует специфический иммунитет. Отсутствие антителообразования может свидетельствовать о необходимости замены вида экспериментальной модели. Кроме того, КПС Hib не стимулирует специфический иммунитет к гетерологичным штаммам NTHi. Иммунизация мышей ЛОС приводила к значимому ($p<0,05$) увеличению уровня антител. Добавление ЛОС к КПС не усиливало антителообразование к КПС. Добавление к БСФ 1 мкг ЛОС усиливало перекрестную протективность обоих препаратов (80-100% мышей выживало). Высокий уровень IgG к ЛОС при иммунизации животных смесью БСФ и ЛОС (ОП=2,6) указывает на стимуляцию гуморального иммунного ответа ЛОС и делает этот антиген значимым в составе комплексного вакцинного препарата, предназначенного для профилактики инфекций, вызываемых капсульными и бескапсульными штаммами гемофильной палочки.

Развитие инфекционного процесса изучали на легочной модели заражения [6], так как по нашему мнению, она разработана с учетом органотропности *H.influenzae* к тканям дыхательных путей и легких. После заражения иммунизированных комплексным препаратом животных формирования инфекционного процесса напрямую зависело от развития иммунного ответа на введение комплексного препарата. Таким образом, препарат, содержащий 10 мкг БСФ и 1 мкг ЛОС, обладал перекрестной протективной активностью, защищая 80-100 мышей от заражения летальными дозами капсульным и бескапсульными штаммами *H.influenzae*. Иммунизация мышей приводила к повышению уровня антител и к ЛОС, и к БСФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. Киев, Наукова думка, 2006.
2. Головинская О.В. Иммунобиологические свойства различных углеводсодержащих препаратов *Haemophilus influenzae*. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 2011.
3. Ефремова В.Е., Егорова Н.Б. Токсичность и протективная активность комплексного антигена стафилококка, полученного методом водной экстракции. Журн. микробиол. 1978, 12:59-63.
4. Онищенко Г.Г. Заболеваемость инфекциями, управляемыми средствами специфической профилактики, в Российской Федерации и задачи по их снижению и ликвидации. Журн. микробиол. 2003, 2:16-28.
5. Овечко Н.Н., Ястребова Н.Е. Антигены поверхностных структур *Haemophilus influenzae* как перспективные кандидат-вакцины, Журн. микробиол. 2017, 4:82-90.
6. Hoover J.L., Lewandowski T.F., Mininger C.L. et al. A robust pneumonia model in immunocompetent rodents to evaluate antibacterial efficacy against *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* or *A. baumannii*. J. Visualized Experiments. 2017, 119, e55068, doi:10.3791/55068.
7. Murphy T.F. Vaccines for nontypeable *Haemophilus influenzae*: the Future Is Now. Clin. Vaccine Immunol. 2015, May; 22(5): 459-466.
8. Sunakawa K., Takeuchi Y., Iwata S. Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) epidemiology. Kansenshogaku Zasshi. 2011, May; 85(3) : 227-237.

РЕЦЕНЗИЯ

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ (Под. ред. Зверева В.В., Бойченко М.Н.). Второе переработанное и дополненное издание. В двух томах. М., ГЭОТАР-МЕДИА, 2018.

Материал учебника представляет детально переработанное первое издание учебника в 2 томах «Медицинская микробиология, вирусология и иммунология» под редакцией академика РАН Зверева В.В., профессора Бойченко М.Н., выпущенного издательством ГЭОТАР-МЕДИА в 2008 г. По сравнению с первым изданием авторский коллектив частично изменен. В написании учебника принял участие авторский коллектив, состоящий из сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М.Сеченова, с привлечением заведующих кафедрами микробиологии ведущих медицинских вузов РФ.

Первый том второго издания, посвященный вопросам общей микробиологии, вирусологии и основам иммунологии, значительно переработан, особенно главы 3, 4, 5, 8. Второй том издания посвящен вопросам частного курса микробиологии. Материал этого тома, изложенный по этиологическому принципу, также тщательно переработан. Некоторые главы, в частности 14 и 19, переписаны полностью. В переработанном варианте много внимания уделяется современным трактовкам молекулярного патогенеза развития инфекционных заболеваний. Взаимодействие микроб-организм хозяина рассматривается в плане молекулярного патогенеза, динамике. Указана роль взаимодействия возбудителя с факторами врожденного иммунитета на развитие патогенеза инфекционного заболевания. Освоение данного материала будет способствовать пониманию протекания инфекционного заболевания и выбора метода лечения при прохождении курса инфекционных болезней.

Материал учебника хорошо проиллюстрирован, добавлены новые рисунки и схемы, что способствует лучшему пониманию студентами изучаемого материала. Переработанный учебник можно отнести к учебникам нового поколения.

Рамазанова Б.А. (К а з а н ь)

ЮБИЛЕЙ

К 100-летию РосНИПЧИ «Микроб»

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» создан на базе кафедры микробиологии Саратовского университета как Краевой институт микробиологии и эпидемиологии Юго-Востока РСФСР решением коллегии Наркомздрава России от 15 ноября 1918 г.

В настоящее время РосНИПЧИ «Микроб» — ведущий научно-исследовательский и организационно-методический центр по проблемам особо опасных инфекционных болезней, санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации, биологической безопасности.

РосНИПЧИ «Микроб» обеспечивает функции базовой организации Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации и Координационного Совета в области санитарной охраны

территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекций.

Коллективом института, возглавляемым академиком РАН, доктором медицинских наук, профессором, лауреатом Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники Владимиром Викторовичем Кутыревым, разработана и внедрена в Российской Федерации единая система эпидемиологического надзора за чумой и другими особо опасными инфекционными болезнями, методология внедрения и реализации Международных медико-санитарных правил (2005), модель обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в ходе проведения массовых международных мероприятий, научно обосновано содержание широкого формата биологической безопасности.

Институт обеспечивает постоянную противоэпидемическую готовность учреждения и его специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ). Сотрудники института за 100-летний период более 300 раз участвовали в ликвидации эпидемий и вспышек особо опасных инфекционных болезней. В соответствии с инициативой Российской Федерации по укреплению глобальной сети по предупреждению и ликвидации последствий ЧС различного характера (2006 г.) на основе инновационных разработок созданы и внедрены в практику уникальные мобильные противоэпидемические комплексы СПЭБ на базе автошасси, не имеющие мировых аналогов.

Специалисты РосНИПЧИ «Микроб» обеспечивали санитарно-эпидемиологическое благополучие при проведении ряда важных массовых мероприятий с международным участием. В 2014—2016 гг. специалисты института участвовали в ликвидации эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике и в настоящее время продолжают оказание практической помощи по предотвращению вспышек особо опасных инфекционных болезней.

Институт «Микроб» участвует в реализации российских программ международной помощи по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия, осуществляемых при поддержке Правительства Российской Федерации.

РосНИПЧИ «Микроб» — единственный производитель в Российской Федерации препарата для специфической профилактики бешенства — антирабического иммуноглобулина, обеспечивает более 75% потребности страны; таблетированной химической холерной вакцины, а также более 30 диагностических препаратов для особо опасных инфекций.

За последние 15 лет РосНИПЧИ «Микроб» подготовил свыше 3000 специалистов учреждений Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения, Министерства обороны и других ведомств, а также более 800 зарубежных специалистов профильных учреждений по вопросам биологической безопасности, эпидемиологии, микробиологии и профилактики особо опасных инфекций.

РосНИПЧИ «Микроб» является учредителем научно-практического журнала «Проблемы особо опасных инфекций — единственного в России научно-практического издания, специализирующегося на освещении широкого круга вопросов особо опасных инфекционных болезней, санитарной охраны территории Российской Федерации и зарубежных стран.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В 2018 ГОДУ

- Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Милованова А.В., Аммури Ю.И., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Жаворонок С.В., Зверев В.В. Получение рекомбинантного белка Ogr3 вируса гепатита E 3 генотипа и оценка его антигенных свойств. V, 46-53.
- Алимов А.В., Резайкин А.В., Бурцева Ю.Ю., Усольцева П.С., Шарабрин С.В. Эпидемиологические особенности групповой заболеваемости энтеровирусной инфекцией в Уральском федеральном округе и Западной Сибири в 2017 году. VI, 49-55.
- Андрющенко С.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В., Бекпергенова А.В. Генетическая характеристика адаптивного потенциала бифидобактерий биотопа дистального отдела кишечника человека. IV, 4-11.
- Анохина Е.П., Исува М.М., Старцева С.В., Мотина Е.А., Михайлова Н.А., Корнеева О.С. Исследование пребиотических, иммуностимулирующих свойств фукозы и ее влияния на репродуктивную функцию. VI, 110-114.
- Ахматова Н.К., Калинин Е.О., Макаренко И.Д., Ахматова Э.А., Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю., Михайлова Н.А. Цитокиновый профиль дендритных клеток мышей под воздействием белков *Pseudomonas aeruginosa* Oprf и Tох. II, 15-23.
- Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Воронова Г.А., Балахонов С.В. Влияние плазмидного состава *Yersinia pestis* на образование биопленки в организме блох с разной векторной активностью. II, 76-83.
- Балахонов С.В., Войткова В.В., Дубровина В.И., Корытов К.М., Корнева А.В., Шкаруба Т.Т. Иммунофенотипирование клеток крови экспериментальных животных, иммунизированных клеточными стенками *Francisella tularensis* разных подвидов. V, 3-9.
- Балахонов С.В., Щучинов Л.В., Мищенко А.И., Матросов А.Н., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Корзун В.М., Косилко С.А., Тагызова С.Л., Топорков В.П., Попов Н.В., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Организация профилактических противоэпидемических мероприятий в целях снижения риска осложнения эпидемиологической ситуации по чуме на территории Республики Алтай. VI, 85-94.
- Балмасова И.П., Сепиашвили Р.И., Славянская Т.А., Малова Е.С., Сепиашвили Я.Р. Коинфекция вирусами гепатитов В и дельта: молекулярная биология возбудителей и перспективы фармакотерапии. II, 95-102.
- Брико Н.И., Глушкова Е.В. Состояние и тенденции эпидемической ситуации по стрептококковой (группы А) инфекции в России в последние годы. I, 10-17.
- Брико Н.И., Батыршина Л.Р., Брико А.Н. Оценка прогностической, эпидемиологической и экономической эффективности вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у мужчин трудоспособного возраста с различными хроническими заболеваниями. I, 17-23.
- Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю., Тимофеева А.В. Микробный консорциум и окситоцин в социальном поведении детей с расстройствами аутистического спектра. IV, 62-68.

- Бурмистров Е.М., Рыбаченко Т.Н., Каражас Н.В., Бошняк Р.Е., Веселовский П.А., Лысенкова М.Ю., Месина Е.Р., Сташко Т.В. Выявление герпесвирусных инфекций у детей первого полугодия жизни. V, 87-92.
- Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Никифоров И.А. Функциональные группы бифидофлоры кишечной микробиоты в ассоциативном симбиозе человека. I, 3-10.
- Бухарин О.В., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Бондаренко Т.А., Смолягин А.И. Иммунорегуляторный профиль микросимбионтов кишечного биотопа человека. IV, 42-51.
- Васильева О.В., Волюнкина А.С., Кузнецова И.В., Писаренко С.В., Куличенко А.Н. Молекулярно-генетическая характеристика штамма *Shigella sonnei*-2013, выделенного при вспышке дизентерии в Республике Абхазия в 2013 году. I, 72-76.
- Ворошилина Е.С., Зорников Д.Л., Боронина Л.Г. Результаты определения видового состава лактобацилл при использовании молекулярно-генетических и культуральных методов исследования. IV, 17-21.
- Гриценко В.А., Мавзютов А.Р., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Тягалева Я.В., Белоусова Ю.П. Генетический профиль *Staphylococcus aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией. IV, 56-62.
- Гусева О.Е., Лебедько О.А., Наговицына Е.Б., Лазуткин М.Н., Савицкая Е.А., Киосов С.В., Путилина О.В. Особенности вспышки внебольничной пневмонии, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*, у детей в Хабаровском крае. I, 39-45.
- Драгомерецкая А.Г., Троценко О.Е., Бебенина Л.А., Курганова О.П., Игнатьева М.Е., Зайцева Т.А., Копылов П.В., Маслов Д.В., Жданова Н.И., Рубцова А.А., Фунтусова О.А., Феделеш И.Ю. Цистный эхинококкоз в Дальневосточном федеральном округе: современное состояние проблемы. VI, 80-85.
- Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Титова С.В., Корнеева Л.А. Действие N-ацетил-L-цистеина на биопленки холерного вибриона. II, 83-87.
- Ефременко Д.В. Биологическая безопасность массовых мероприятий: особенности лабораторной диагностики. I, 45-52.
- Жукова Л.И., Г.К. Рафеев, Горodin В.Н., Ванюков А.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика энтеровирусных неполиомиелитных инфекций в Краснодарском крае. V, 9-15.
- Жуков К. В., Топорков А. В., Викторов Д. В. Эпидемиологические аспекты и современная эволюция глобально распространяющихся арбовирусов. VI, 94-103.
- Захарова Ю.В. Бактериальный микробиом кишечника ВИЧ-инфицированных людей. II, 102-109.
- Захарова И. Б., Топорков А. В., Викторов Д. В. Мелиоидоз и сап: современное состояние проблемы и актуальные вопросы эпидемиологического надзора. VI, 103-110.
- Земсков А.М., Земсков В.М., Земскова В.А., Сениахвили Р.И., Золоедов В.И. Инфекция и иммунитет у больных из групп риска. II, 109-119.
- Зорина В.Н., Воробьева О.Н., Зорин Н.А. Активность лактоферрина различного происхождения в отношении грамположительных кокков и *Candida albicans*. II, 54-58.
- Калиниченко Е.О., Сходова С.А., Ахматова Н.К., Михайлова Н.А. Иммунизация белками *Pseudomonas aeruginosa* OprF и aTox усиливает фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов у мышей. II, 10-15.

- Капков В.И., Васильева С.Г., Лобакова Е.С. Сукцессии цианобактерий в водоемах бореальной зоны. IV, 100-107.
- Карамзин А.М., Терешин Н.М. Влияние микрофлоры ЖКТ на ожирение. Применение пробиотиков как лекарственных средств. I, 113-119.
- Киреева А.Г., Калинина О.В., Киселев А.М., Брико Н.И., Глушкова Е.В., Дмитриев А.В. Распространенность генетического элемента ICE-erm12, содержащего гены устойчивости tetM и ermB, среди российских и вьетнамских штаммов стрептококков группы А. II, 23-30.
- Козырина Н.В., Ладная Н.Н., Нарсия Р.С. Пути элиминации вертикальной передачи ВИЧ-инфекции. VI, 18-25.
- Кравцов А.Л., Генералов С.В., Кожевников В.А., Гаврилова Ю.К., Абрамова Е.Г., Кочкин А.В., Никифоров А.К. Определение доли инфицированных вирусом бешенства клеток линии Vero с помощью проточной цитометрии. III, 18-25.
- Кудряшова А.М., Галстян А.Г. Файзулов Е.Б., Оленин А.Ю. Лисичкин Г.В. Зверев В.В., Борисова О.В. Выявление аденовирусного антигена методом твердофазного иммуноферментного анализа с ГКР-детекцией сигнала. III, 25-32.
- Кулаков Ю. К. Молекулярные механизмы персистенции возбудителя бруцеллеза. IV, 68-76.
- Мазурина С.А., Данилина Г.А., Смирнова М.Ю., Осипова. Г.Л., Гервасиева В.Б., Конищева А.Ю., Оспельникова Т.П. Микробиота нижних отделов дыхательных путей при хронических обструктивных заболеваниях легких. V, 53-60.
- Малыгина О.Г., Бажукова Т.А. Становление микробиоценоза толстой кишки у недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела на первом году жизни. V, 60-66.
- Марцев А.А., Рудакова В.М., Ильина А.В. Эпидемиологическая и эпизоотическая обстановка по природно-очаговым зоонозным инфекциям во Владимирской области. V, 20-26.
- Матосова Е.В., Андрюков Б.Г. Антимикробные механизмы нейтрофилов как перспективные мишени для фармакологической модуляции неспецифической защиты организма. III, 96-105.
- Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Атлас-руководство. IV, 124-125.
- Меринова О.А., Топорков А.В., Меринова Л.К., Антонова Е.В., Викторов Д.В. Биологическая безопасность: анализ современного состояния системы подготовки специалистов в Российской Федерации. III, 87-96.
- Михайлова Н.А., Воеводин Д.А., Поддубиков А.В. Коррекция дисбиоза — основа регенеративной медицины. V, 107-113.
- Михайлова Н.А., Калошин А.А., Зиминая Е.М., Солдатенкова А.В., Поддубиков А.В. Доклинические исследования рекомбинантной вакцины синегнойной. VI, 31-37.
- Мокроусов И.В., Пасечник О.А., Вязовая А.А., Блох А.И., Черняева Е.Н., Стасенко В.Л. О важности применения эволюционно надежных маркеров для детекции штаммов *Mycobacterium tuberculosis* генетического семейства LAM. III, 60-67.
- Молчанова Е.В., Агеева Н.П. Научно-методические аспекты совершенствования деятельности коллекции патогенных микроорганизмов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. III, 117-126.

- Мочалкин П.А., Мочалкин А.П., Степанов Е.Г., Фарвазова Л.А., Попов Н.В. Факторы, обуславливающие групповую заболеваемость ГЛПС в зимний период на территории республики Башкортостан. V, 15-20.
- Немцева Н.В., Гоголева О.А., Игнатенко М.Е. Биомедицинский потенциал альго-бактериальных симбиозов. IV, 82-87.
- Носкова О.А., Анганова Е.В., Гвак Г.В., Савилов Е.Д. Эпидемиологические аспекты сепсиса. V, 121-126.
- Образцова О.А., Алейникова К.А., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. Вариабельность нуклеотидных последовательностей гена агр у российских изолятов *Treponema pallidum*. III, 45-53.
- Оксанич А.С., Никонова А.А., Зверев В.В. Рекомбинантные антитела в противовирусной терапии: достижения и перспективы. VI, 114-123.
- Орлова О.Г., Рыбальченко О.В., Эрман М.В., Первунина Т.М., Фонтуренко А.Ю. Риск развития инфекционного процесса у детей с сочетанными врожденными пороками развития сердца и почек. I, 23-32.
- Осельникова Т.П., Морозова О.В., Андреева С.А., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Бурцева Е.И., Мукашева Е.А., Ершов Ф.И. Особенности биомаркеров воспаления при гриппе. III, 67-74.
- Остапенко Н.А., Козлова И.И., Соловьева М.Г., Степанова Т.Ф., Мефодьев В.В. Опыт расследования крупной вспышки туляремии среди населения г. Ханты-Мансийск и Ханты-Мансийского района в 2013 году. VI, 44-48.
- Отрашевская Е.В., Винокурова В.Н., Шитиков Е.А., Сотникова Е.А., Перевышина Т.А., Колченко С.А., Бутусова Т.Б., Кострюкова Е.С., Ильина Е.Н., Игнатьев Г.М. Изучение генетической стабильности суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) в процессе производства вакцины БЦЖ. II, 58-68.
- Пахомов Д.В., Машилов К.В., Костинова А.М. Иммунопрофилактика в лечении ВИЧ-инфицированных пациентов с бронхолегочной патологией. III, 80-87.
- Петухова Е.С., Воробьев Д.С., Семенова И.Б. Роль белков *Streptococcus pneumoniae* в разработке серотипнезависимых пневмококковых вакцин. III, 74-80.
- Пименова А.С., Борисова О.Ю., Петрова М.С., Власов Е.В., Воронина И.С., Борисова А.Б., Афанасьев С.С., Донских Е.Е., Кафарская Л.И., Алешкин В.А., Алешкин А.В., Афанасьев М.С., Караулов А.В. Оптимизация метода ускоренной генодиагностики коклюша на основе изотермической амплификации (LAMP). V, 37-46.
- Плавинский С.Л., Ладная Н.Н., Зайцева Е.Е., Баринаева А.Н. Пораженность ВИЧ-инфекцией среди уязвимых групп населения в России — результаты интегрированного биоповеденческого исследования в 2017 г. VI, 10-18.
- Платонов А.Е., Koetsveld J., Стуколова О.А., Долгова А.С., Колясникова Н.М., Топоркова М.Г., Сарксян Д.С. Бактерицидное действие сыворотки крови человека на *Borrelia miyamotoi*, возбудителя иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ-БМ). I, 58-67.
- Платонов А.Е., Koetsveld J., Колясникова Н.М., Стуколова О.А., Долгова А.С., Топоркова М.Г., Сарксян Д.С. Взаимодействие нейтрофилов человека с *Borrelia miyamotoi*, возбудителем иксодового клещевого боррелиоза. II, 30-38.
- Полеева М.В., Чеминов О.С. Использование масс-спектрометрического анализа для детекции бактериальных токсинов. I, 93-101.

- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Михеева И.В. Реализация программы иммунизации в Российской Федерации на современном этапе: вызовы, возможности, перспективы. VI, 3-10.
- Прокопьева Е.А., Шаршов К.А., Романовская А.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Соловьева Е.И., Шестопалова Л.В., Зайковская А.В., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М. Сравнительный анализ патогенности вирусов гриппа A(H5N1) и A(H1N1)pdm09 у лабораторных мышей. II, 38-45.
- Пузырева Л.В., Родькина Л.А., Мордык А.В., Конченко В.Д., Далабаева Л.М. Анализ инфекций нижних дыхательных путей с исследованием микробного пейзажа материала у ВИЧ-инфицированных пациентов. I, 76-85.
- Пушкарева В.И., Ермолаева С.А. Экспериментальное обоснование роли растений в эпидемиологии сапронозных инфекций. V, 113-121.
- Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Савинков П.А., Бошнян Р.Е., Лысенкова М.Ю., Корниенко М.Н., Бурмистров Е.М., Веселовский П.А., Солдатова И.А. Зависимость выявления маркеров оппортунистических инфекций от приверженности АРВТ у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями. IV, 76-82.
- Савельева И.В., Куличенко А.Н., Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Васильева О.В., Жиров А.М., Еременко Е.И., Подопригора Е.И., Бабенышева Б.В., Кузнецова И.В., Гусева Л.В. MLVA-типирование клинических штаммов генетически измененных *Vibrio cholerae* biotype El Tor, изолированных в России и Украине в период седьмой пандемии холеры. VI, 37-43.
- Самарцева Т.Г., Оксанич А.С., Гаврилова Н.Ф., Яковлева И.В., Свиридов В.В., Зверев В.В. Применение универсальных плазмидных конструкций для получения полноразмерных рекомбинантных антител заданной специфичности в эукариотических клетках. III, 32-40.
- Савлевич Е.Л., Иванова М.А., Мокроносова М.А., Горбунов С.А., Якушенкова А.П. Сезонные особенности микробного пейзажа небных миндалин у здоровых студентов. V, 98-103.
- Святченко С.В., Дурыманов А.Г., Суслопаров И.М., Колосова Н.П., Гончарова Н.И., Петрова О.В., Епанчинцева А.В., Максюткова А.В., Кондик К.С., Слабода О.К., Иванова Е.В., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б., Ильичева Т.Н. Тяжелые случаи заболевания гриппом на территории Российской Федерации в течение эпидемических сезонов 2015-2016 и 2016-2017. I, 32-39.
- Сгибнев А.В., Кремлева Е.А. Модификация ферментативной и антибактериальной активности лизоцима метаболитами вагинальных лактобацилл. IV, 21-27.
- Седов А.М., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Санин А.В., Зубашев И.К., Измestьева А.В., Иванова А.М., Парфенова Т.М., Шульженко А.Е., Зуйкова И.Н., Шубелко Р.В., Халдин А.А., Исаева Д.Р., Селькова Е.П., Григорьева Е.А. Механизм противовирусного действия и оценка эффективности нового препарата Фортепреп® при комплексной терапии хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекции генитальной локализации. V, 81-87.
- Селиванова Е.А., Хлопко Ю.А., Гоголева Н.Е., Плотников А.О. Детекция потенциально патогенных бактерий в солоноватых реках Приэльтонья методом высокопроизводительного секвенирования. IV, 87-95.
- Семененко Т.А., Акимкин В.Г. Сероэпидемиологические исследования в системе надзора за вакциноуправляемыми инфекциями. II, 87-95.

- Семенцова А.О., Дедков В.Г., Терновой В.А., Чуб Е.В., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Максютов Р.А., Малеев В.В., Попова А.Ю. Клиническая лабораторная диагностика лихорадки Эбола. Анализ существующих методик и диагностических средств. III, 105-117.
- Семин Е.Г., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю., Каратаев Г.И. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа ptxP3. IV, 33-42.
- Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Карулина Н.В., Чухряя О.В., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В. Некоторые экологические характеристики вируса Эбола в природных очагах. II, 119-126.
- Соломенный А.П., Зубарева Н.А. Особенности рекомбинационной геномики бактерий рода *Acinetobacter* — патогенов человека. III, 40-45.
- Собянин К.А., Сысолятина Е.В., Чаленко Я.М., Лаврикова А.Я., Калинин Е.В., Пушкарева В.И., Ермолаева С.А. Роль природных вариантов факторов инвазии *Listeria monocytogenes* в перинатальном листериозе. IV, 114-119.
- Степанова Т.Ф. Оценка эффективности нового подхода к анализу активности эпидемического процесса и результативности профилактики паразитарных заболеваний. VI, 61-65.
- Сухина М.А., Образцов И.В., Михалевская В.И., Ачкасов С.И., Сафин А.Л., Шелыгин Ю.А. Алгоритм лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи. II, 45-54.
- Тартаковский И.С., Груздева О.А., Карпова Т.И., Дронина Ю.Е., Тарасова Т.А., Логинова О.Г., Дмитриева М.Н. Анализ эффективности различных методических подходов, направленных на элиминацию планктонных клеток и биопленок легионелл в потенциально опасных водных системах. IV, 119-124.
- Твердохлебова Т.И., Думбадзе О.С., Ермакова Л.А., Ковалев Е.В., Алешукина А.В., Нагорный С.А., Болатчиев К.Х., Хуторянина И.В. Ситуация по ларвальным гельминтозам на юге России и оптимизация эпидемиологического надзора за ними. VI, 72-80.
- Титков А.В., Платонов А.Е., Стуколова О.А., Миронов К.О., Дмитриева Г.М., Кострыкина Т.В., Сорокина О.В., Черных В.И., Миноранская Н.С. Эпидемиологические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в Красноярском крае в контексте изучения распространенности инфекции, вызываемой *Borrelia miyamotoi*. III, 10-18.
- Тюленева Е.Г., Москвитина Э.А. Эпидемиологическая оценка миграции населения в возможности заноса холеры в субъекты Российской Федерации. III, 3-10.
- Ульшина Д.В., Еременко Е.И., Ковалев Д.А., Рязанова А.Г., Кузнецова И.В., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Сирица Ю.В., Куличенко А.Н. Выявление особенностей масс-спектров белковых экстрактов споровой и вегетативной форм возбудителя сибирской язвы методом времяпролетной масс-спектрометрии. VI, 66-72.
- Урядова Г.Т., Горельникова Е.А., Фокина Н.А., Долмашкина А.С., Карпунина Л.В. Влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий на синтез провоспалительных цитокинов макрофагами мышей при фагоцитозе *Staphylococcus aureus*. I, 67-72.
- Файзулов Е.Б., Корчевая Е.Р., Марков Д.В., Петруша О.А., Зверев В.В. Проблема контаминации культур клеток орторевовирусами млекопитающих. V, 103-107.

- Фельдблюм И.В., Романенко В.В., Николаева А.М., Субботина К.А., Соснина О.Ю., Перминова О.А., Белякова О.В., Данилина Т.В., Ершов А.Е., Трофимов Д.М., Быкова Е.А., Мартиросян С.В., Анкудинова А.В. Результаты многоцентрового клинического исследования новой комбинированной вакцины АКДС-ГепВ+Ніb производства НПО «Микроген» при иммунизации детей 6 месяцев. II, 68-76.
- Фельдблюм И.В., Романенко В.В., Меньшикова М.Г., Окунева И.А., Макаров А.Е., Исаева Н.В., Радзивил М.Г. Сравнительная оценка безопасности и иммуногенности вакцины для профилактики полиомиелита инактивированной (Нидерланды) и вакцины «Имовакс Полио» (Франция) при трехкратной иммунизации детей. III, 53-60.
- Фельдблюм И.В., Субботина К.А., Новгородова С.Д., Игнатъев Г. М., Алыева М.Х., Ерофеева М.К., Орловский В.Г., Ленева И.А., Мельников С.Я., Казакова Е.В., Начарова Е.П., Трухин В.П. Реактогенность, безопасность и иммуногенность отечественной гриппозной инактивированной расщепленной вакцины Флю-М при иммунизации взрослых 18-60 лет. V, 31-37.
- Хамитова И.В., Останкова Ю.В., Антипова А.Ю., Семенов А.В., Лаврентьева И.Н. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов парвовируса В19, циркулирующих на территории Северо-Западного федерального округа. VI, 55-61.
- Храпова Н.П., Меринова Л.К., Замарина Т.В., Фролов Д.М., Сенина Т.В., Корсакова И.И. Применение реакции латекс-агглютинации на основе моноклональных антител для обнаружения и идентификации возбудителя мелиоидоза в пробах с объектов внешней среды и биологического материала. I, 85-93.
- Цветкова Е.В., Алешина Г.М., Леонова Л.Е., Шамова О.В., Романовская Е.В., Кокряков В.Н. Функциональные свойства θ -дефенсинов из лейкоцитов крови гамадрила *Paro hamadryas*. V, 66-73.
- Чеканова Т.А., Шпынов С.Н., Тарасевич И.В. Авидность специфических IgG к *Rickettsia prowazekii* как дополнительный критерий серологической дифференциальной диагностики эпидемического сыпного тифа и его рецидивирующей формы — болезни Брилля-Цинссера. V, 73-81.
- Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Кисиль С.В., Сарычева М.А., Востров А.В. Механизмы бактерицидного действия в реализации общих антибактериальных эффектов катионов металлов в культуре *Streptococcus pyogenes*. II, 3-10.
- Червакова М.П., Шаров Т.Н., Баркова И.А., Барков А.М., Викторов Д.В., Топорков А.В. Идентификация иммуногенных белков штаммов *Bacillus anthracis* в MALDI TOF MS. I, 52-58.
- Червинец В.М., Червинец Ю.В., Беляева Е.А., Петрова О.А., Ганина Е.Б. Метаболическая активность высокоантагонистических штаммов лактобацилл здорового человека. IV, 11-17.
- Черкасов С.В., Селиванова Е.А. Итоги IX Российской научной конференции с международным участием «Персистенция и симбиоз микроорганизмов». VI, 124-126.
- Шапиро Т.Н., Дольникова Г.А., Немцева Н.В., Санджиева Д.А., Лобакова Е.С. Идентификация и физиологическая характеристика консорциума углеводов окисляющих бактерий нефти и нефтепродуктов. IV, 107-114.

Шевченко А.В., Медведева О.А., Мухина А.Ю., Королев В.А., Калуцкий П.В. Состав нормобиоценоза толстого кишечника и прооксидантно-антиоксидантный баланс плазмы крови, колоноцитов при экспериментальном дисбиозе и использовании пробиотика РиоФлора Иммуно Нео. IV, 27-33.

Шишкова Ю.С., Долгушина В.Ф., Графова Е.Д., Завьялова С.А., Курносенко И.В., Евстигнеева Н.П., Громакова К.Г., Колесников О.Л., Чукичев А.В., Долгушин И.И. Взаимосвязь функционального статуса нейтрофилов цервикального секрета у беременных женщин с видовым составом лактофлоры. IV, 51-56.

Шишкова Ю.С., Бабикова М.С., Емелина А.С., Филимонова О.И., Тезиков Д.А., Долгушин И.И. Микрофлора полости рта и состояние факторов противоинфекционной защиты у лиц, использующих стоматологические ортопедические конструкции (СОК). V, 92-98.

Шубникова Е.В., Меринова Л.К., Сенина Т.В., Король Е.В., Меринова О.А. Биопленки патогенных буркхольдерий и их роль в резистентности к антибиотикам. I, 101-113.

Ющук Н.Д., Малов И.В., Baatarkhuu O., Савилов Е.Д., Малов С.И., Расулов Р.И., Дворниченко В.В., Lkhagva-Ochir T., Amarsanaa J., Decaens T., Marche P.N. Клинико-эпидемиологические проявления гепатоцеллюлярной карциномы в этнических группах европейцев и монголоидов, проживающих на территории Северо-Восточной Азии. VI, 25-31.

Яковлева И.В., Курбатова Е.А., Ахматова Э.А., Сухова Е.В., Яшунский Д.В., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э., Свиридов В.В. Получение моноклональных антител к тетрасахариду — синтетическому аналогу капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 14 и их иммунохимическая характеристика. V, 26-31.

Яценко-Степанова Т.Н., Игнатенко М.Е. Потенциально опасные *Suapobacteria* лечебных грязей. IV, 95-100.

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

**БЛАГОДАРИМ ВСЕХ ПОДПИСАВШИХСЯ НА ЖУРНАЛ
НА I ПОЛУТОДИЕ 2019 г. В ЭТОМ ГОДУ ЖМЭИ ИСПОЛНЯЕТСЯ 95 ЛЕТ.
И В ЭТОМ ЮБИЛЕЙНОМ ГОДУ, И В ДАЛЬНЕЙШЕМ МЫ НАДЕЕМСЯ
НА НАШЕ С ВАМИ ПЛОДОТВОРНОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО.**

РЕДКОЛЛЕГИЯ, РЕДАКЦИЯ.

СОДЕРЖАНИЕ

К 100-ЛЕТИЮ НИИ ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА

Блинкова Л.П., Зверев В.В., Свитич О.А., Филатов Н.Н., Митрофанов В.В. К 100-летию научно-практической деятельности НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.	3
Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И., Жукина М.В., Кабаргина В.Ю., Милованова А.В., Воробьев Д.С., Аммура Ю.И., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Малинникова Е.Ю., Жаворонок С.В., Блинов В.М., Зверев В.В. Разработка рекомбинантного белка капсида вируса гепатита Е третьего генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств . . .	10
Alatortseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Luhverchik L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., Zhukina M.V., Kabargina V.Yu., Milovanova A.V., Vorobev D.S., Ammur Yu.I., Mikhailov M.I., Kyuregyan K.K., Malinnikova E. Yu., Zhavoronok S.V., Blinov V.M., Zverev V.V. Development of hepatitis E 3 genotype recombinant protein capsid of: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties	
Арзуманян В.Г., Артемьева Т.А., Иксанова А.М. Противогрибковая активность сыворотки крови человека и некоторых млекопитающих.	17
Arzumanyan V.G., Artemeva T.A., Iksanova A.M. Antifungal activity of human and some mammals sera	
Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В., Романенко Э.Е., Батуро А.П., Михайлова Н.А. Свойства нативных белоксодержащих антигенов <i>Streptococcus Pneumoniae</i> . . .	22
Vorobyev D.S., Semenova I.B., Volokh Yu.V., Romanenko E.E., Batur A.P., Mikhailova N.A. Properties of native protein-containing antigens of <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Грубер И.М., Егорова Н.Б., Асташкина Е.А., Ахматова Н.К., Курбатова Е.А., Черкасова Л.С., Кукина О.М. Иммуногенные свойства клеточных и внеклеточных белоксодержащих антигенов <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Gruber I.M., Egorova N.B., Astashkina E.A., Akhmatova N.K., Kurbatova E.A., Cherkasova L.S., Kukina O.M. Immunogenic properties of cellular and extracellular protein-containing antigens of <i>Staphylococcus Aureus</i>	
Гулимов М.К., Романцова Л.Р., Астапенко А.В., Щетинина Ю.Р., Прокофьева Е.В., Мовсисян Г.В., Зверев В.В., Аммура Ю.И. Влияние аутофагии на репликацию вируса краснухи.	36
Gulimov M.K., Romantsova L.R., Astapenko A.V., Schetinina Yu.R., Prokofeva E.V., Movsesyan G.V., Zverev V.V., Ammur Yu.I. Autophagy regulation by rubella virus	
Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Ахматова Н.К., Грубер И.М. Поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4 и иммунотерапевтическая концепция ее использования для профилактики и лечения заболеваний, вызываемых условно патогенными микроорганизмами.	43
Egorova N.B., Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Gruber I.M. Polycomponent vaccine Immunovac-VP-4 and immunotherapeutic concept of its use for the prevention and treatment of diseases caused by opportunistic microorganisms	

Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Культивирование биопленок <i>Bordetella pertussis</i> на абиотическом субстрате.	49
Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Cultivation of <i>Bordetella pertussis</i> biofilms on abiotic substrate	
Крылова Н.В., Федореев С.А., Лавров В.Ф., Мищенко Н.П., Васильева Е.А., Свитич О.А., Эбралидзе Л.К., Иунихина О.В., Леонова Г.Н. Противовирусная и антиоксидантная активность эхинохрома А и композиции антиоксидантов на его основе.	53
Krylova N.V., Fedoreev S.A., Lavrov V.F., Mischenko N.P., Vasileva E.A., Svitich O.A., Ebrali-dze L.K., Eunihina O.V., Leonova G.N. Antiviral and antioxidant activity of the composition of compounds based on echinochrome A	
Конищева А.Ю., Гervазиева В.Б., Мазурина С.А. Особенности профиля медиаторов воспаления и аутореактивности при бронхиальной астме, сочетанной с ожирением	59
Konischeva A.Yu., Gervazieva V.B., Mazurina S.A. Clinical and immunological inflammatory patterns of bronchial asthma in obese patients	
Курбонов К.М., Симонова Е.Г., Филатов Н.Н. Особенности сезонности бруцеллеза среди населения Республики Таджикистан	63
Kurbonov K.M., Simonova E.G., Filatov N.N. Features of seasonal manifestation of brucellosis infection among the population of the Republic of Tajikistan	
Ленева И.А., Егоров А.Ю., Фалынскова И.Н., Махмудова Н.Р., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Вартанова Н.О., Поддубиков А.В. Индукция вторичной бактериальной пневмонии у мышей при заражении пандемическим и лабораторным штаммами вируса гриппа H1N1	68
Leneva I.A., Egorov A.Yu., Falynskova I.N., Makhmudova N.R., Kartashova N.P., Glubokova E.A., Vartanova N.O., Poddubikov A.V. Induction of secondary bacterial pneumonia in mice infected with pandemic and laboratory strains of the H1N1 influenza virus	
Михайлова Н.А., Зими́на Е.М., Солдатенкова А.В., Калошин А.А. Разработка вакцины на основе рекомбинантных антигенов синегнойной палочки	74
Mikhailova N.A., Zimina E.M., Soldatenkova A.V., Kaloshin A.A. Development of the vaccine based on the recombinant antigens of <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	
Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Потемкин И.А., Алсалих Н.Д., Исаева О.В., Карлсен А.А., Кичатова В.С., Поляков А.Д. Парадокс Балаяна	80
Mikhailov M.I., Malinnikova E.Yu., Kyuregyan K.K., Potemkin I.A., Alsalikh N.D., Isaeva O.V., Karlsen A.A., Kichatova V.S., Polyakov A.D. Balayan paradox	
Носик М.Н., Рыжов К.А., Потапова А.Б. Особенности репликации ВИЧ-1 субтипа А6 в присутствии гормонов, входящих в состав современных гормональных контрацептивов.	85
Nosik M.N., Ryzhov K.A., Potapova A.B. Replication of HIV-1 subtype A6 in the presence of hormones included in the modern hormonal contraceptives	
Петруша О.А., Черниченко Т.Л., Кофиади И.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Эффективность метода петлевой изотермической амплификации с флуоресцентной детекцией в диагностике парвовирусного энтерита у плотоядных.	90
Petrusha O.A., Chernichenko T.L., Kofidi I.A., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Effectiveness of the loop-mediated isothermal amplification with fluorescent detection in the diagnosis of parvovirus enteritis in carnivores	
Солдатенкова А.В., Зими́на Е.М., Кудряшова А.М., Гаврилова Н.Ф., Яковлева И.В., Борисова О.В., Свиридов В.В., Михайлова Н.А. Разработка иммуноферментных методов оценки контроля качества рекомбинантной вакцины синегнойной	95

<i>Soldatenkova A.V., Zimina E.M., Kudryashova A.M., Gavrilova N.F., Yakovleva I.V., Borisova O.V., Sviridov V.V., Mikhailova N.A.</i> Development of elisas for the quality control of a recombinant <i>Pseudomonas</i> vaccine	
<i>Филина А.Б., Свитич О.А., Аммур Ю.И., Голенков А.К., Клинушкина Е.Ф., Зверев В.В.</i> Изучение экспрессии генов CXCL12, CCR4, EGFR в мигрирующих клетках миело-монобластного лейкоза до и после химиотерапии	100
<i>Filina A.B., Svitich O.A., Ammur Yu.I., Golenkov A.K., Klinushkina E.F., Zverev V.V.</i> Study of CXCL12, CCR4, EGFR gene expression in migrating myelomonoblastic leukemia cells before and after chemotherapy	
<i>Фошина Е.П., Серова Т.А., Бишева И.В., Слатинова О.В.</i> Эффективность применения Иммуновак ВП-4 в отношении иммунологических показателей у часто и длительно болеющих детей	104
<i>Foshina E.P., Serova T.A., Bisheva I.B., Slatinova O.V.</i> The effectiveness of Immunovac VP-4 for immunological parameters in frequently and long-term ill children	
<i>Ястребова Н.Е., Токарская М.М., Елкина С.И., Овечко Н.Н., Барановская С.А.</i> Иммунобиологическая активность комплексного препарата против гемофильной инфекции	111
<i>Yastrebova N.E., Tokarskaya M.M., Elkina S.I., Ovechko N.N., Baranovskaya S.A.</i> The immunobiological activity of the complex preparation against <i>Haemophilus influenzae</i> infection	

РЕЦЕНЗИЯ

<i>Медицинская микробиология, вирусология и иммунология (под ред. Зверева В.В., Бойченко М.Н.)</i>	116
--	-----

ЮБИЛЕЙ

К 100-летию РосНИПЧИ «Микроб»	116
-------------------------------	-----

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В 2018 ГОДУ	118
--	-----



ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

Редколлегия принимает на рассмотрение статьи по вопросам медицинской микробиологии и биотехнологии, эпидемиологии, вакцинологии, экологии микроорганизмов, иммунотерапии и иммунодиагностики инфекционных болезней человека, а также работы, освещающие закономерности иммунного ответа на возбудители, секретируемые ими продукты и их антигены.

При направлении статей в ЖМЭИ авторам следует соблюдать следующие правила:

1. Статья должна иметь направление от учреждения. Присылать по почте (п. 13) 2 экз. статьи через 2 интервала на компьютере с лазерным принтером шрифтом не меньше 12—14 кегля. Не будут приниматься «слепые» распечатки бумажного варианта статей. К бумажному варианту должен быть приложен лазерный компакт-диск в жесткой упаковке только с текстом статьи, литературой, табл., резюме, подрис. подписями, если есть рис. (рис. на отдельном диске). Размер статей не должен превышать у оригинальных 10—12 стр., обзоров 15 стр., кратких сообщений 8 стр., остальных 3—5 стр.

2. В выходных данных указывать инициалы и фамилии авторов (иностраннх в иностранной транскрипции), название работы, учреждение, город. Статья должна быть подписана всеми авторами с указанием только для одного из авторов (для контактной информации) полных имени и отчества, места работы, ученого звания, ученой степени, служебного адреса (с индексом города) и служебного телефона; сотового телефона и e-mail (если есть) в конце статьи в набранном виде. Необходимы цифровые ссылки у фамилий авторов и у институтов, где они работают.

3. Оригинальная статья должна состоять из разделов: Введение, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение. К оригинальным статьям, обзорам и кратким сообщениям должно прилагаться резюме на русском и английском языках с указанием авторов, названия статьи, институтов (на отдельной страничке, не более 1500 знаков каждое) и ключевые слова на русском и английском языках. Резюме должно иметь разделы: Цель, Материалы и методы, Результаты, Заключение. В резюме к обзорам разделы не нужны.

4. Количество рис. и таблиц в сумме не должно превышать 3. Принимаются только графики, схемы, микрото, филогенетические деревья. Микрофото должны быть контрастными, 6х9 или 5х8, в 2 экз. В подписи указать окуляр, объектив и метод окраски или импрегнации. Графики и схемы должны быть четкими, не перегружены подписями. Иллюстрации принимаются только в черно-белом варианте. Размер филогенетического дерева не более 1/2 печатной странички. Кроме бумажного варианта иллюстраций необходим файл иллюстративных программ (TIFF и др.) на отдельном диске. Таблицы не должны дублировать графики, иметь краткое название, быть компактными, с «шапками», точно отражающими содержание граф. Цифры в таблицах должны быть статистически обработаны и соответствовать таковым в тексте. Не принимаются табл. размером более 1 печатной стр. Перечисляемые праймеры не должны превышать 1/4 печатной стр.

5. Родовые и видовые названия микроорганизмов, инфраподвидовые категории, наименования семейств должны соответствовать принятым Международным таксономическим комитетом (9 изд. «Руководство по систематике бактерий Берги»). Первый раз название бактерий пишется полностью (*Shigella flexneri*), далее род одной прописной буквой, вид полностью со строчной (*S. flexneri*). Наименования семейств пишутся полностью.

6. В математических формулах размечать строчные и прописные, подстрочные и надстрочные буквы. Сокращения (за исключение общепринятых химических и математических величин) не допускаются. Использовать только единицы СИ.

7. Литература (в оригинальных статьях не более 15, проблемных и обзорах не более 50, кратких сообщениях не более 10) печатается на отдельном листе колонкой в алфавитном порядке (русские авторы, потом иностранные). В тексте дается ссылка на порядковый номер списка. В списке приводятся все отечественные авторы, иностранные — 3 автора et al., название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для книг, патентов и авторефератов диссертаций давать точное название. Ссылки на тезисы конференций, симпозиумов, пленумов, съездов и на неопубликованные работы не допускаются. Фамилии иностранных авторов в тексте статьи даются в иностранной транскрипции.

8. Направление в ЖМЭИ работ, посланных в другие редакции, не допускается. Статьи, оформленные не по правилам, редколлегией не рассматриваются и авторам не возвращаются; посылается лишь сообщение редакции о неправильном оформлении.

9. Только при оформлении статей по вышеперечисленным правилам они рецензируются членами редколлегии и/или специалистами профильных научных учреждений. Статьи с положительными рецензиями принимаются в печать. Отклоненные по рецензии рукописи, непрофильные статьи и рекомендованные для доработки авторам не возвращаются, посылается только решение редколлегии и рецензия. Поступившие после переработки рукописи вновь рассматриваются на заседании редколлегии и при выполнении автором рекомендаций рецензента принимаются в печать. Датой поступления статьи считается дата ее принятия в печать.

10. Редакция оставляет за собой право редактировать статьи, сокращать или исправлять их, а также помещать в виде кратких сообщений: 8 стр. текста с резюме (п. 3) и литературой (п. 7) без рисунков и таблиц.

11. Плата с аспирантов за публикацию статей не взимается.

12. При выполнении экспериментальных работ авторы обязаны придерживаться «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». В статье необходимо указывать вид, количество использованных животных, методы обезбоживания и умерщвления.

13. Статьи направлять: mech.inst@mail.ru.