

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»
ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических
препаратов им. М.П. Чумакова РАН»

Тезисы докладов

Научно-практической конференции молодых ученых
**«Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики,
лечения и профилактики инфекционных и
онкологических заболеваний»**

Москва
17–18 апреля 2018 г.

Содержание

Акулова Екатерина Борисовна	2
Алиева Камилла Натиговна	4
Андреева Дарья Владимировна	6
Баранова Анна Александровна.....	7
Барановская Софья Александровна	9
Богомолова Елена Григорьевна	11
Буравченко Галина Игоревна	13
Владимиров Сергей Алимович	14
Волков Михаил Борисович.....	15
Глубокова Екатерина Андреевна	16
Голибродо Василиса Антоновна	18
Гольшкин Александр Владимирович	19
Гулимов Михаил Константинович	20
Дементьева Юлия Назымовна	21
Елагина Татьяна Николаевна	23
Зиминая Екатерина Максимовна	24
Калиниченко Евгений Олегович	25
Карташова Надежда Павловна.....	27
Кичатова Вера Сергеевна.....	28
Козловцева Дарья Владимировна	30
Корчевая Екатерина Романовна	32
Курашова Светлана Сергеевна	34
Литвинова Валерия Александровна	35
Милованова Александра Владимировна.....	36
Моисеенко Елена Игоревна	38
Нуриев Ринат Ильшатович	39
Петухова Екатерина Сергеевна	41
Печелюлько Анастасия Александровна	42
Пиняева Анастасия Николаевна	43
Пиядина Анастасия Юрьевна	44
Полиенко Александра Евгеньевна.....	46
Прокофьева Елена Викторовна.....	47
Пруцкова Екатерина Владимировна	48
Синёва Ольга Николаевна.....	50
Смирнова Анастасия Олеговна	52
Тучинская Ксения Константиновна	54
Тюрин Антон Павлович	55
Хромова Екатерина Александровна.....	56
Целых Ирина Олеговна	57
Чистякова Дарья Алексеевна	58
Шатунова Полина Олеговна.....	60

Разработка ДНК-вакцины против ВИЧ-1

Акулова Екатерина Борисовна

Гос. НИИ ОЧБ, Лаборатория молекулярной биологии ВИЧ

Научный руководитель:
д.б.н., профессор А.П. Козлов

Введение. Со времени выделения СПИДа как самостоятельного заболевания в 1981 г. в мире, по оценкам ВОЗ, официально зарегистрировано около 60 миллионов ВИЧ-инфицированных человек, из них около 30 миллионов умерло от СПИДа.

Несмотря на огромные усилия мирового сообщества, пандемию ВИЧ-инфекции остановить не удается. Одним из направлений исследований в данной области является разработка вакцин против ВИЧ/СПИД.

ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России совместно с Биомедицинским центром разработана ДНК-вакцина «ДНК-4», которая представляет собой смесь четырех плазмидных ДНК в изотоническом растворе хлорида натрия, которые, попадая в клетки вакцинируемого организма, синтезируют в них вирусные белки Nef, Gag, Pol (rt) и gp140.

В 2011 году вакцина «ДНК-4» успешно прошла I фазу клинических испытаний, в ходе которых были показаны ее безопасность и иммуногенность. В настоящее время вакцина «ДНК-4» завершила II фазу клинических испытаний, которые проводились в рамках протокола «Многоцентровое, двойное-слепое, плацебо-контролируемое исследование безопасности, иммуногенности и подбора оптимальной дозировки вакцины ДНК-4 у пациентов с ВИЧ-1, получающих стабильную антиретровирусную терапию (АРТ) первой линии».

Цель. Оценка безопасности и иммуногенности различных режимов дозирования вакцины «ДНК-4» у пациентов с ВИЧ-1, получающих стабильную антиретровирусную терапию первой линии, оценка влияния вакцины «ДНК-4» на динамику вирусной нагрузки и уровень цитотоксических и хелперных Т-клеток.

Методы. В ходе исследования оценивалась безопасность различных режимов дозирования вакцины «ДНК-4» у пациентов с ВИЧ-1, получающих стабильную антиретровирусную терапию первой линии, на основании частоты и степени тяжести нежелательных явлений, зарегистрированных в течение всего периода исследуемой терапии и последующего наблюдения, по данным субъективных жалоб, физикального обследования, оценке жизненных показателей и лабораторных анализов. Для оценки иммуногенности изучается уровень цитотоксических (CD3+CD8+) и хелперных (CD3+CD4+) Т-клеток, динамика вирусной нагрузки, в том числе частота повышения вирусной нагрузки выше 50 копий/мл, так называемые «blips», которые связывают с формированием возвратной виремии и лекарственной устойчивости.

Результаты. В исследование рандомизированы 54 пациента (17 пациентов в группу ДНК-4 0,25 мг, 17 пациентов в группу ДНК-4 0,5 мг и 20 пациентов в группу Плацебо). Пациенты каждой группы прошли четырехкратную иммунизацию в дни 0, 7, 11, 15, после которых наступал период наблюдения продолжительностью 22 недели.

Было показано, что вакцина «ДНК-4» является безопасной и хорошо переносится ВИЧ-инфицированными пациентами, получающими стабильную АРТ. В ходе исследования не было зарегистрировано смертей или серьезных побочных эффектов. У четырех вакцинированных пациен-

тов была обнаружена нейтропения и лейкопения. Местные реакции встречались у вакцинированных групп и группы плацебо с одинаковой частотой.

Мы обнаружили, что три участника исследования (в группах 0.25 мг и 0.5 мг) имели повышенную амплитуду “blips” (18000 копий/мл и 2800 копий/мл в группе 0.25 мг; 709 копий/мл в группе 0.5 мг), в то время как частота “blips” была одинаковой у вакцинированных и невакцинированных пациентов. Это может быть связано с реактивации провирусных геномов и/или освобождению латентных вирусных РНК. Разрушение латентных вирусных резервуаров может являться следствием индукции клеточного иммунитета и экспрессии ФНО α у вакцинированных пациентов (показано ранее).

Заключение. Терапевтическая ДНК-вакцинация, осуществляемая на фоне АРТ, у ряда пациентов может приводить к разрушению латентных вирусных резервуаров. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, приводит ли ДНК-вакцинация (или повторная ДНК-вакцинация) на фоне АРТ к полному освобождению от ВИЧ-1 (eradication) и уничтожению латентных вирусных резервуаров у некоторых пациентов.

Комбинированная антибиотикотерапия как подход к преодолению устойчивости *Staphylococcus aureus*: противомутантная эффективность комбинации линезолида с даптомицином в динамической системе *in vitro*

Алиева Камилла Натиговна

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, Лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики

Научный руководитель:
д.б.н., член-корр. РАН А.А. Фирсов

Актуальность работы. Несмотря на высокую противостафилококковую эффективность линезолида, в клинике все чаще выявляются устойчивые мутанты *S. aureus*. Селекция таких мутантов наблюдалась и в динамических системах, моделирующих фармакокинетику линезолида *in vitro* при его 5-дневном введении с 12-часовым интервалом. Установленные в этих экспериментах «антимутантные» – предотвращающие селекцию устойчивых мутантов – значения площади под кривой «концентрация антибиотика – время» (ПФК) соответствовали клинически достижимым лишь для 2 штаммов *S. aureus*. Для 2 других штаммов (*S. aureus* 10 и *S. aureus* ATCC 700699) при клинических значениях ПФК происходило нарастание численности устойчивых мутантов в процессе введения линезолида. Селекцию линезолидоустойчивых мутантов *S. aureus* 10 удалось подавить путем комбинирования линезолида с рифампицином. Этот эффект был обусловлен снижением концентрации линезолида, предотвращающей селекцию мутантов (МПК_М) в присутствии рифампицина.

Целью настоящего исследования явилась оценка возможности преодоления устойчивости *S. aureus* ATCC 700699 к линезолиду при его комбинированном применении с даптомицином.

Материалы и методы. Эксперименты были проведены со штаммом *S. aureus* ATCC 700699 (МПК = 2 и 0,5 мкг/мл для линезолида и даптомицина, соответственно). В динамической системе *in vitro* моделировали терапевтические режимы 5-дневного введения линезолида с интервалом 12 ч (ПФК в пределах 24 ч = 240 мкг×ч/мл) и даптомицина с интервалом 24 ч (ПФК = 480 мкг×ч/мл) по отдельности и в комбинации. Чтобы гарантировать наличие устойчивых клеток на момент начала эксперимента, использовали смешанный инокулят (воспроизводимая частота мутаций к линезолиду равна 10⁻⁸) с селекционированными ранее устойчивыми мутантами.

Результаты. Значения площади под кинетическими кривыми изменения общей численности чувствительных и устойчивых клеток (AUBC, обратная мера эффективности: чем выше AUBC, тем слабее противобактериальное действие) были равны 470, 240 и 210 (lg КОЕ/мл)×ч для линезолида, даптомицина и их комбинации, соответственно. Таким образом, эффективность комбинации оказалась в 2,2 раза выше, чем при монотерапии линезолидом. В результате комбинированного применения линезолида и даптомицина площадь под кривой изменения численности клеток, устойчивых к 2×МПК линезолида (AUBC_М), уменьшалась с 256 и до 14 (lg КОЕ/мл)×ч. При этом величина AUBC_М для клеток, устойчивых к 2×МПК даптомицина, снижалась с 97 до 24 (lg КОЕ/мл)×ч. Таким образом, эффективность комбинации в отношении устойчивых субпопуляций *S. aureus* была соответственно в 18 и 4 раза выше по сравнению эффективностью линезолида и даптомицина при монотерапии, соответственно. Это можно объяснить с позиций теории окна селекции мутантов (ОСМ), согласно которой обогащение микробной популяции устойчивыми клетками наиболее вероятно, когда концентрация антибиотика превышает МПК, но не достигает МПК_М. Так, при комбинированном применении антибиотиков МПК_М линезолида уменьшилась в 3,3 раза (3 вместо 10

мкг/мл), а МПК_М даптомицина – в 2,3 раза (6 вместо 14 мкг/мл). В результате время, в течение которого концентрация линезолида находилась в пределах ОСМ сократилось с 53% интервала дозирования, а для даптомицина – с 35%, до 0.

Выводы.

1. Применение линезолида в комбинации с даптомицином позволяет предотвратить селекцию мутантов *S. aureus*, устойчивых к обоим антибиотикам.
2. Высокая «антимутантная» эффективность комбинации антибиотиков прямо связана со снижением их МПК_М в отношении стафилококков.

Синтез и цитотоксическая активность антра[2,3-*b*]тиофен-3-карбоксамидов

Андреева Дарья Владимировна

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, Лаборатория химической трансформации антибиотиков

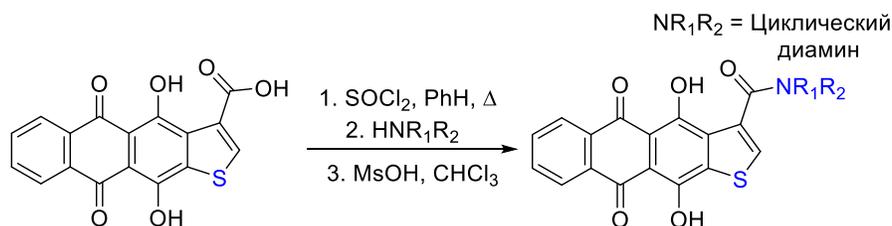
Научные руководители:

к.х.н. А.С. Тихомиров

д.х.н., профессор РАН А.Е. Щекотихин

Гетероарен-конденсированные антрацендионы являются перспективным классом для поиска новых химиотерапевтических средств. Ряд амидов антра[2,3-*b*]фуран-3-карбоновой кислоты обладает мультитаргетным действием на опухолевые клетки за счет ингибирования активности топоизомераз 1 и 2, протеинкиназ, а также индуцирует образование активных форм кислорода.

Для анализа роли гетероатома в антипролиферативных свойствах была проведена биоизостерная модификация антра[2,3-*b*]фуранов в производные антра[2,3-*b*]тиофена, получена серия амидов антра[2,3-*b*]тиофен-3-карбоновой кислоты и проведен скрининг биологической активности.



Цитотоксичность соединений (МТТ-тест) исследована на клетках лимфолейкоза К-562, ее резистентной линии К-562/4 (с гиперэкспрессией Pgp), а также клетках карциномы кишечника НТС116 и ее сублинии НТС116p53КО (с делецией гена p53). Установлено, производные ингибируют пролиферацию опухолевых клеток в интервале от низких микромолярных до субмикромолярных концентраций. Большинство полученных антра[2,3-*b*]тиофен-3-карбоксамидов преодолевают оба механизма лекарственной устойчивости. Результаты скрининга показали, что наиболее активными оказались производные, содержащие 3- и 4-аминопиперидиновый остаток в карбоксамидном фрагменте.

Биологически активные соединения, продуцируемые микромицетами симбионтами многоножек Вьетнама

Баранова Анна Александровна

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, Лаборатория химического изучения биологически активных соединений
микробного происхождения

Научные руководители:

д.х.н. В.А. Коршун

д.б.н. В.С. Садыкова

В связи с глобальным развитием множественной резистентности к уже имеющимся антибиотикам, возникла необходимость в поиске совершенно новых природных продуцентов антибиотических веществ. Скрининг культур выделенных из необычных экониш (тропических лесов, щелочных и засоленных почв, эндобионтов беспозвоночных) представляет собой перспективу для создания обширных коллекций продуцентов новых антибиотиков.

Целью исследования являлась оценка антибиотического потенциала микроскопических грибов – эндосимбионтов кишечного тракта многоножек из национального парка Катъен (Cat Tien), Вьетнам, отбор продуцентов антибиотиков и их химическая идентификация.

Объектами исследования были 18 штаммов грибов рода *Trichoderma* и два штамма рода *Fusarium*, выделенные в качестве симбионтов штаммов грибов рода *Trichoderma*. Культуры были изолированы из гнилой древесины, подстилки, свежих (суточных) экскрементов многоножек-ос, многоножек-драконов, черных многоножек, отобранных в национальном парке Катъен (Cat Tien) на юге Вьетнама.

Представители микромицетов родов *Trichoderma* и *Fusarium* имеют общую экологическую нишу и конкурируют за существование в ней и взаимодействие с растением-хозяином. Однако, нами было показано, что грибы способны к симбиотическому росту и не проявляют выраженного антагонизма. Механизмы симбиотических связей грибов на протяжении эволюции зависели от многих факторов и потому весьма разнообразны, в том числе за счет образования антибиотиков.

Из 18 штаммов *Trichoderma sp.*, выделенных из многоножек антифунгальной и антибактериальной активностью обладали все штаммы, для одного из них 014 была установлена высокая активность в отношении всех тест-культур. При исследовании микроскопических свойств наблюдали симбиотических рост двух культур, одна из которых была идентифицирована как *T. asperelloides* Samuels, а другая как *Fusarium sp.* Причем, симбионт штамма 014 *Fusarium sp.* рос на всех специфических средах только в присутствии штамма 014, формировал только стерильный мицелий, без макро и микроконидий, характерных для этого рода, что не позволило идентифицировать его до вида.

При стационарном культивировании на жидкой среде Чапека штамма рода *Fusarium sp.*, в симбиозе с штаммом 014 *T. asperelloides* было выделено активное вещество, которое обладало незначительной антифунгальной активностью, а также выраженным бактерицидным действием. На основании масс-спектров высокого разрешения и корреляционных спектров ЯМР активное вещество было идентифицировано как фузариевая кислота. Данный антибиотик-поликетид (Рис.1.), известен как микотоксин с низкой или средней токсичностью.

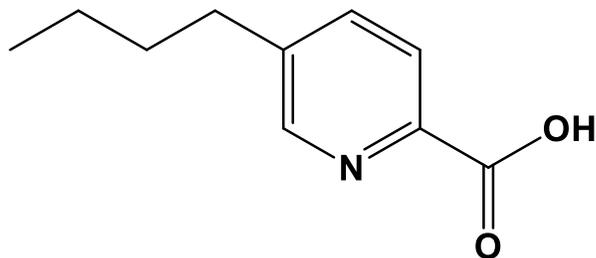


Рис.1. Структура фузариевой кислоты

В проведенном нами исследовании фузариевая кислота главным образом, была активна в отношении грамположительных бактерий и грибов *Aspergillus niger*. Для кислоты были определены МПК в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 21027 – 32 мг/мл и *Bacillus subtilis* ATCC 6633 – 64 мг/мл.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 18-33-00044 и № 16-44-240509

Влияние различных условий культивирования *Streptococcus pneumoniae* на продукцию капсульного полисахарида

Барановская Софья Александровна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория иммунохимической диагностики

Научный руководитель:
д.м.н., профессор Н.Е. Ястребова

Для разработки и производства вакцин против пневмококковой инфекции необходимы стандартные методы культивирования *S. pneumoniae*, позволяющие получить достаточное количество капсульного полисахарида (КПС) высокой степени очистки. Так как КПС выделяют из культуральной жидкости, то питательная среда, используемая для культивирования, должна обеспечивать высокую скорость роста пневмококков и способствовать синтезу КПС. Кроме того, среда не должна содержать продукты животного происхождения и высокомолекулярные соединения, которые впоследствии могут осложнить очистку КПС. Высокий выход КПС при выращивании каждого штамма и отсутствие необходимости дополнительной очистки позволят сократить затраты при производстве вакцины.

Цель. Оценка накопления КПС штаммами *S. pneumoniae* различных серотипов при стационарном и управляемом культивировании.

В работе использовали штаммы *S. pneumoniae* 9N, 9V, 14 и 23F серотипов, депонированные в НЦЭСМП как штаммы-продуценты КПС. Все штаммы выращивали в полусинтетической питательной среде объемом 8 литров, источником аминокислот в которой являлся соевый пептон при 37°C в стационарных (в колбе), и в контролируемых условиях (в ферментере). При выращивании в ферментере контролировали pH среды и содержание глюкозы. Накопление КПС в процессе культивирования оценивали по результатам РИЭФ проб культуральной жидкости для 9N, 9V, 23F серотипов и торможения ИФА для 14 серотипа.

Длительность культивирования составляла от 7 до 15 часов (таблица 1). Посевная доза варьировала от 0,08 до 0,122. При выращивании штаммов *S. pneumoniae* в ферментере наиболее интенсивный рост наблюдался через 3-6 часов после начала экспоненциальной фазы, при этом значения оптической плотности достигали 6,8-6,9. При культивировании в ферментере накопление КПС в среде культивирования происходило по мере роста культуры (рисунок 1). По данным РИЭФ в конце экспоненциальной фазы роста в среде культивирования содержалось от 163 до 400 мкг/мл КПС. При этом количество КПС на момент окончания культивирования в колбах не превышало 116 мкг/мл. На протяжении экспоненциальной фазы роста содержание КПС в культуральной жидкости увеличилось на 25%, что сопоставимо с результатами зарубежных исследователей. Выход очищенного КПС был выше при выращивании штаммов в ферментере. По химическому составу препараты КПС, полученные при управляемом культивировании, содержали меньше белка и нуклеиновых кислот и были наиболее очищенными. Таким образом, исследования показали, что управляемое культивирование *S. pneumoniae* в ферментере в полусинтетической питательной среде позволяет получать КПС высокого качества в количестве, достаточном для производства вакцин против пневмококковой инфекции.

Таблица 1. Параметры культивирования штаммов *S. pneumoniae* и выход КПС

Штамм <i>S. pneumoniae</i>	Процесс культивирования	Контролируемые параметры			Время культивирования, часов	Посевная доза (OD ₀)	OD, μ=530 нм	Вес сухого полисахарида, г	Хим. состав полученных препаратов, %		
		Поддержание pH	Подача CO ₂	Подача воздуха					Белок	Углеводы	Нуклеиновые кислоты
9N шт. 96420	стационарное	-	+	-	11	0,08	1,6	2,28	5,5	70	11,3
	управляемое	+	+	+	9	0,09	6,8	3,797	5,5	78,3	0,65
9V шт. 74	стационарное	-	+	-	15	0,12	1,45	0,6	4,5	70	6,7
	управляемое	+	+	+	10	0,122	6,9	5,33	2	50	0
23F шт. 96521	стационарное	-	+	-	7	0,1	3,2	2	4	76,6	0,9
	управляемое	+	+	-	9,5	0,115	6,8	3,59	4	60	0,9
14 шт. 883	стационарное	-	+	-	10	0,11	1,63	-	-	-	-
	управляемое	+	+	+	12	0,1	1,85	-	-	-	-

**Динамика роста и накопление КПС
S. pneumoniae сер. 23F**

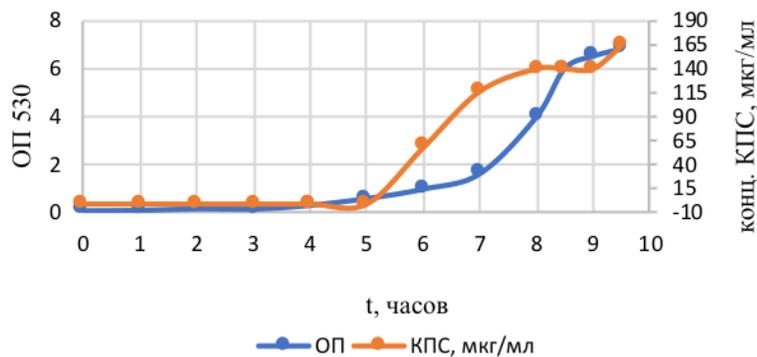


Рисунок 1. Динамика роста и накопление КПС *S. pneumoniae* сер. 23F

Соавторы: С.И. Елкина, М.М. Токарская, Д.В. Козловцева

Разработка кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8

Богомолова Елена Григорьевна

Гос. НИИ ОЧБ, Лаборатория генетической инженерии вакцин

Научные руководители:
к.б.н., доцент И.В. Духовлинов

Актуальность. По данным Всемирной организации здравоохранения, ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младшего возраста. Широкий спектр клинических проявлений колеблется от преходящей легкой диареи до тяжелой диареи и рвоты, вызывающих дегидратацию, нарушение электролитного баланса, шок и при отсутствии лечения смерть. Для профилактики ротавирусной инфекции применяются вакцины, основанные на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, размножающиеся в кишечнике человека. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков является более безопасным, поскольку не ассоциировано с введением вируса в организм, пусть и аттенуированного.

Цель: Целью данной работы была разработка кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка и проведение ее доклинического изучения по параметрам безопасности и специфической активности.

Материалы и методы. Антиген кандидатной вакцины (суспензия для в/м введения 0,04 мг/мл, ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ», Россия) - химерный рекомбинантный белок FLiCVP6VP8 - включает в себя высокоиммуногенные эпитопы капсидных белков ротавируса VP6 и VP8, а также фрагменты флагеллина *Salmonella typhimurium* в качестве внутримолекулярного адъюванта. Изучение безопасности проводили по параметрам острой токсичности и местно-раздражающего действия, субхронической токсичности на половозрелых и неполовозрелых животных, аллергенности и иммунотоксичности, мутагенности и риска канцерогенного действия. Специфическая активность была изучена на лабораторной модели инфекции, разработанной с использованием самок мышей линии BALB/c 9-12-недельного возраста. Препаратом сравнения служила коммерческая вакцина Rotarix® (GlaxoSmithKline), контрольным веществом - физиологический раствор. Кандидатную вакцину и контрольное вещество животным вводили внутримышечно, коммерческую вакцину - перорально. Животных иммунизировали двукратно с интервалом в 2 недели. Уровень ротавирусного антигена в фекалиях и специфичных антител в сыворотках крови и смывах кишечника определяли методом ИФА.

Результаты и их обсуждение. Проведенные в рамках доклинических испытаний исследования продемонстрировали иммуногенность и безопасность кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8. Кандидатная вакцина не обладает токсичностью и раздражающим действием в месте введения, соответствует требованиям 4 класса опасности «вещества малоопасные» (ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества»). Кандидатная вакцина обладает иммуностимулирующим действием. Уровень ротавирусного антигена в фекалиях дважды иммунизированных кандидатной вакциной и впоследствии зараженных ротавирусом животных был менее 10 нг/мл, также как и у животных, иммунизированных коммерческой вакциной. Уровень ротавирусного антигена в контрольной группе - 635 нг/мл. Полученные результаты свидетельствуют, что эффективность разработанной вакцины сравнима с таковой у коммерческой вакцины. Про-

тективный эффект кандидатной вакцины в отношении мышиноного ротавируса ассоциировался с продукцией вирусспецифичных IgA и IgG в сыворотке крови и в кишечнике иммунизированных животных. В настоящее время на мировом рынке доступны вакцины на основе живого аттенуированного штамма ротавируса. Применение данных вакцин связано с риском возникновения тяжелого побочного эффекта – инвагинации кишечника, который был зарегистрирован при применении первой лицензированной вакцины RotaShield, отозванной вскоре после регистрации. В силу того, что разрабатываемая кандидатная вакцина не содержит живого компонента в своем составе, ее использование не связано с увеличением риска возникновения данного патологического состояния. Эффективность кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 сопоставима с таковой коммерческой вакцины Rotarix® (Glaxo Smith Kline) при большей безопасности кандидатной вакцины, за счет отсутствия живого вируса в ее составе.

Выводы. Результаты проведенных исследований показали, что кандидатная вакцина против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 обладает высокой иммуногенностью (обеспечивает формирование титра специфических антител в сыворотках крови двукратно внутримышечно иммунизированных мышей Balb/c более 1:128000), протективностью (способствует подавлению размножения ротавируса в кишечнике иммунизированных животных на 98% по сравнению с неиммунизированным контролем), относится к 4 классу безопасности (вещества малоопасные), что позволяет рекомендовать ее для получения разрешения на проведение клинических испытаний.

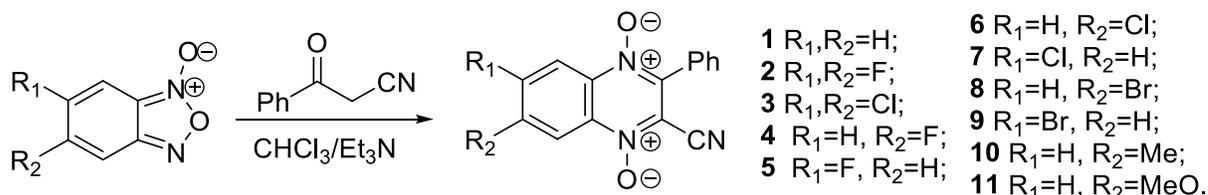
Исследование роли заместителей в цитотоксичности хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов

Буравченко Галина Игоревна

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, Лаборатория химической трансформации антибиотиков

Научный руководитель:
д.х.н., профессор РАН А.Е. Щекотихин

Производные хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксида обладают высокой цитотоксичностью для опухолевых клеток, находящихся в условиях гипоксии. Также показано, что 6,7-дифтор-3-фенилхиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксид высокоактивен в отношении резистентных опухолевых клеток (МЛУ). Для изучения влияния заместителей в положении 6 (7) гетероцикла на биологическую активность синтезирована серия производных 3-фенил-хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов **1-11**. На клетках аденокарциномы молочной железы (MCF7, MDA-MB-231) изучена способность соединений **1-11** блокировать опухолевый рост (МТТ-тест) в условиях нормоксии (21%) и гипоксии (1%). Также исследована антипролиферативная активность хиноксалин 1,4-диоксидов **1-11** на резистентных клетках лимфолейкоза K562/4 и карциномы кишечника НСТ-116p53KO (p53^{-/-}) с активизированными механизмами МЛУ.



Большинство из полученных хиноксалин 1,4-диоксидов продемонстрировали большую цитотоксичность и гипоксическую селективность в отношении опухолевых клеток аденокарцином человека MCF-7 и MDA-MB-231, чем препарат сравнения тирапазамин. Также показано, что в отличие от доксорубина (IR=5) все синтезированные соединения имеют близкие значения IC₅₀ в отношении клеточных линий карциномы кишечника (НСТ-116 и НСТ-116p53KO) с индексом резистентности IR<1. Выявлено, что гибель опухолевых клеток MCF7 и MDA-MB-231 в условиях гипоксии связана с генерацией активных форм кислорода и ингибированием сигнального пути HIF-1α, приводящем к снижению транскрипции VEGF-A.

Изучение влияния точечных мутаций на динамическое поведение белков оболочки флавивирусов методом молекулярной динамики

Владимиров Сергей Алимович

МГУ им. Ломоносова, Химический факультет, Лаборатория медицинской химии

Научный руководитель:
к.х.н. Д.И. Осолодкин

Целью данной работы является изучение влияния точечных мутаций на динамическое поведение белков E оболочки вирионов вирусов клещевого энцефалита и Повассан методом моделирования молекулярной динамики.

Выравнивание аминокислотных последовательностей белков оболочки E вирусов клещевого энцефалита и Повассан было произведено в ClustalX 2.1. Модели димеров белков E были построены с помощью программы Modeller 9.14. Моделирование молекулярной динамики проводилось в неявно заданном растворителе с использованием силовых полей AMBER ff99SB и GLYCAM06 в комплексе программ AMBER. С использованием известной структуры димера белка E вируса клещевого энцефалита (PDB ID 1SVB) были построены по гомологии шесть моделей димерной формой белка оболочки E вирусов клещевого энцефалита и Повассан.

Был проведен анализ структурных различий и сходств моделей. В результате анализа траекторий моделирования молекулярной динамики выявлены динамические особенности поведения моделей и установлено влияние точечных мутаций в аминокислотных последовательностях белков на их свойства.

На основе анализа результатов моделирования молекулярной динамики установлено влияние точечных мутаций в аминокислотных последовательностях белков оболочки E вирусов клещевого энцефалита и Повассан на их динамическое поведение.

Соавторы: Орлов А.А., Палюлин В.А., Осолодкин Д.И.

Моделирование связывания низкомолекулярных соединений с тримером эктодомена белка оболочки E вируса денге

Волков Михаил Борисович

МГУ им. Ломоносова, Химический факультет, Лаборатория медицинской химии

Научные руководители:

А.А. Орлов

к.х.н. Д.И. Осолодкин

к.х.н. В.А. Палюлин

Вирус денге является возбудителем одноимённой лихорадки, которая ежегодно диагностируется у десятков миллионов человек. В настоящий момент отсутствуют одобренные для использования в клинической практике вакцины и лекарства против лихорадки денге. В качестве мишеней для действия лекарств предлагается ряд белков вируса, в том числе белок оболочки E. Последний играет важную роль в проникновении вируса в клетку, обеспечивая слияние мембран за счёт перехода из димерной формы в тримерную в кислой среде эндосомы. Мономер белка E содержит домены I, II, III и четыре α -спирали, образующие мембрано-ассоциированный домен, состоящий из т.н. “стебелька” и “якоря”. Связывание стебелька в полости между доменами I и II необходимо для завершения стадии слияния мембран. Создание низкомолекулярных соединений, ингибирующих это взаимодействие, является перспективной стратегией дизайна новых противовирусных препаратов.

Пептиды, полученные из последовательности стебелька, конкурентно связываются с белком E. За связывание с эктодоменом могут конкурировать и низкомолекулярные соединения. В недавнем исследовании ингибирования связывания фрагмента стебелька был изучен набор из 60 соединений с высоким подобием, из которых 19 показали активность по отношению к ингибированию взаимодействия указанного пептида с тримером рекомбинантного белка E. Для идентификации сайтов связывания соединений, влияющих на конформационный переход, мы применили молекулярный докинг. Набор из 285 случайных молекул из базы данных ZINC15 был использован в качестве отрицательного контроля. Распределение молекулярных масс в отрицательном контроле было приближено к экспериментально изученной выборке. Модель эктодомена белка E для штамма NGS тримера белка E DENV2 была построена по гомологии в программе Modeller 9.14 с использованием структуры тримерного эктодомена белка E вируса денге (код доступа в банке белковых структур PDB 1OK8) в качестве шаблона. Минимизация структуры произведена в Sybyl-X 2.1. Докинг проводился в программе Autodock 4.2.6. Для каждого лиганда производилось 1000 запусков генетического алгоритма в приближении жёсткий рецептор – гибкий лиганд.

Кластеризация результатов докинга каждого лиганда производилась с пороговым значением RMSD 8.0 Å с учётом симметрии макромолекулы. Кластеры конформеров разных лигандов, перекрывающиеся друг с другом (коэффициент Танимото ≥ 0.3), были соотнесены с одними и теми же карманами связывания. Среди обнаруженных сайтов связывания низкомолекулярных соединений были изучены имеющие заселённость более 1000 с учётом всех исследованных лигандов. Были идентифицированы и описаны сайты связывания, позволяющие различить активные и неактивные соединения на основании анализа распределения значений оценочной функции докинга.

Соавторы: А.А. Орлов, Д.И. Осолодкин, В.А. Палюлин

Изучение эффективности противовирусного препарата триазавирин на модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции

Глубокова Екатерина Андреевна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория экспериментальной вирусологии

Научный руководитель:
д.б.н. И.А. Ленева

Актуальность: Грипп является инфекционным заболеванием, наносящим вред здоровью людей и приводящим к огромным экономическим потерям. Большая часть смертельных исходов от гриппа обусловлена вторичными бактериальными осложнениями, среди которых ведущую роль занимают пневмонии. Показано, что лечение гриппозной инфекции этиотропными противовирусными препаратами может быть лучшей стратегией для сокращения вторичных осложнений от гриппа.

Цель: Оценить эффективности противовирусного препарата триазавирин на экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции

Материалы и методы: Моделирование вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции проводили при интраназальном инфицировании мышей BALB вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1), с последующим заражением клиническим изолятом *S. aureus* 1986. В исследовании использовали препарат триазавирин в дозах 25, 50 и 100 мг/кг по схеме за 24 часа до заражения вирусом и далее в течение 5 дней после, дважды в день (утренние и вечерние часы, интервал 8 часов) ежедневно, с помощью зонда внутрижелудочно. В качестве препаратов сравнения использовали озельтамивир в дозе 10 мг/кг/день и умифеновир в дозах 40 и 60 мг/кг/день. Эффективность препаратов оценивали по клиническим признакам (выживаемость, продолжительность жизни, уменьшение снижения массы животных) и вирусологическим (титр вируса в легких) параметрам. Титры вируса определяли при заражении монослоя клеток MDCK 10-кратными разведениями гомогенатов легких мышей и выражали в \log_{10} ТЦИД₅₀/0,1 мл.

Результаты: в группе вирусного контроля (при заражении вирусом отдельно интраназально) не наблюдалась гибели животных. В случае бактериального контроля (при интраназальном заражении *S. aureus* отдельно) также выжили все животные. Комбинированное последовательное заражение патогенами привело к гибели 90% мышей и значительной потере веса (выше 30% на 11 день исследования). Кроме того, титр вируса в легких при последовательном заражении мышей вирусом гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1) и *S. aureus*, были значительно выше, чем титр для группы заражения только вирусом гриппа.

Эффективность лечения препаратом триазавирин зависело от дозы препарата. Лечебное применение триазавирина в дозе 25 мг/кг/день было малоэффективно, снижая смертность животных на 30%, повышая среднюю продолжительность их жизни в 1,3 раза, и статистически незначительно снижая потерю их веса. Наиболее эффективным было лечение триазавирином в дозах 50 и 100 мг/кг/день, которое статистически значимо защищало 67-70% животных от смертности, увеличивало среднюю продолжительность их жизни в 1,7 раза и предотвращало потерю их веса. Кроме того, лечение триазавирином во всех изученных дозах значительно снижало титр вируса, а в дозе 100 мг/кг/день полностью подавляло размножение вируса в легких. Лечение препаратом сравнения озельтамивир, защищало от смертности 41% животных, увеличивая среднюю продолжительность жизни в 1,5 раза. Лечение препаратом умифеновир по клиническим признакам было более эффек-

тивно, чем лечение озельтамивиром, защищая 67% животных, увеличивая их продолжительность жизни в 1,9 раза.

Выводы: Лечебное применение препарата триазавирин в дозе 50 и 100 мг/кг/день было эффективно на модели вторичной бактериальной пневмонии, после гриппозной инфекции. Данное лечение снижало смертность животных и потерю веса, увеличивало их среднюю продолжительность жизни и достоверно уменьшало размножение вируса в легких по сравнению с группой нелеченых животных. Выявленная активность препарата триазавирин на модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции была сравнима с активностью в этой модели контрольных противовирусных препаратов - озельтамивира и умифеновира.

Соавторы: Н.П. Карташова, Н.Р. Махмудова, И.Н. Фалынскова, Е.И. Леонова, И.А. Ленева,
Н.А. Михайлова

Изучение нейротоксических свойств противоопухолевого препарата класса антрафурандионов

Голибродо Василиса Антоновна

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, Лаборатория фармакологии и химиотерапии

Научный руководитель:
д.б.н. Переверзева Э.Р.

Введение. В настоящее время исследование нейротоксических свойств новых лекарственных средств является обязательным этапом на пути продвижения препарата в клиническую практику. В ФГБНУ НИИНА разработан оригинальный противоопухолевый препарат Антрафуран, который проявил при пероральном пути введения высокую противоопухолевую активность в отношении переносимых опухолей мышей. Фармакокинетические исследования показали, что препарат проникает в головной мозг и накапливается в его ткани в высоких концентрациях. Максимальная концентрация достигается через 4-8 часов после введения.

Цель исследования. Провести пилотное исследование нейротоксических свойств антрафурана при однократном пероральном введении максимально переносимой дозы.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 30 беспородных крысах, самках. Лекарственную форму препарата растворяли в воде для инъекций и вводили перорально в дозе 170 мг/кг (МПД). Контрольным животным вводили растворитель. Проводили тестирование в установке «открытое поле» через 1, 4, 8 часов и повторное тестирование через сутки после введения. Регистрировали двигательную и исследовательскую активность животных при помощи программы Etho-Vision 8.5.

Результаты. После введения препарата у крыс была снижена как двигательная (пройденное расстояние, средняя скорость), так и исследовательская (число вертикальных стоек, контактов с «норками») активность по сравнению с контролем. Эти эффекты проявились в наибольшей степени через 4 часа после введения препарата. Менее значительно снижение показателей было отмечено также через 1 и 8 часов после введения. Через сутки при повторном тестировании этой группы исследуемые показатели увеличились, тогда как у животных контрольной группы при повторном посещении знакомой обстановки «открытого поля» они понизились.

Заключение. Предварительное исследование показало, что антрафуран оказывает ингибирующее влияние на двигательную и исследовательскую активность крыс. Обратимость нейротоксического действия препарата, а также его влияние на другие виды нервной деятельности будут оценены в дальнейших исследованиях.

Антиоксидантная активность и физиолого-биохимические характеристики базидиального гриба *Hericium erinaceus* в зависимости от способов предобработки опилок сосны и бука

Гольшшкин Александр Владимирович

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, Лаборатория биосинтеза биологически активных соединений

Научные руководители:
д.б.н. Л.М. Краснопольская

Субстраты для получения плодовых тел ксилотрофных базидиомицетов подбираются производителем и никак не регламентируются по компонентному составу и способам предобработки. Как правило, основой субстратов служат опилки лиственных пород деревьев, костра льна, лузга подсолнечника, солома и другие отходы лесопереработки и сельского хозяйства. Подготовленный субстрат перед инокуляцией культурой гриба подвергают процессам пастеризации или стерилизации. Такие процессы можно рассматривать не только как способы снижения количества контаминантов, но и как способы предобработки. Добавление воды и повышенная температура способствует набуханию волокон целлюлозы и облегчает дальнейшую зарастание мицелием субстратного блока. В настоящее время разработано и применяется большое количество методов предобработки лигно-целлюлозного сырья, способных увеличить биодоступность целлюлозы за счёт снижения доли гемицеллюлоз, лигнина и экстрактивных компонентов.

Цель настоящей работы состояла в установлении зависимости физиолого-биохимических характеристик базидиального гриба *Hericium erinaceus* от способа предобработки лиственных и хвойных опилок. Предобработку производили с использованием растворов минеральных кислот, щелочи и пероксида водорода. Оценивали влияние произведенной предобработки сосновых и буковых опилок на скорость роста мицелия и его плотности. Для *H. erinaceus* большей биодоступностью отличались опилки после кислотных предобработок. При этом наибольшая скорость роста и плотность мицелия была отмечена на субстратах с опилками после солянокислотной предобработки. Проведение твердофазного культивирования *H. erinaceus* на выбранных субстратах и сравнение полученных результатов с контролем показало, что кислотная предобработка способствует существенному уменьшению времени выхода на плодоношение и увеличивает суммарную урожайность. Было изучено содержание белков и полисахаридов в плодовых телах. Плодовые тела первой и второй волн значительно различались по содержанию белков и полисахаридов: базидиомы второй волны, отличались повышенным содержанием белков и пониженным содержанием полисахаридов, чем базидиомы первой волны. Использование опилок хвойных пород повышает содержание фенольных соединений по сравнению с субстратами на основе опилок лиственных пород. Антирадикальная активность этанольных экстрактов плодовых тел также выше у базидиом полученных на опилках сосны. Кислотная предобработка способствует повышению общей доли лигнина в субстрате, что способствовало повышению содержания фенольных соединений в плодовых телах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 16-38-00902 мол_а.

Влияние аутофагии на репликацию вируса краснухи

Гулимов Михаил Константинович

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория экспериментальной иммунологии

Научный руководитель:
к.б.н. Ю.И. Аммур

Аутофагия является эволюционно сложившимся клеточным катаболическим и защитным механизмом, посредством которого клетки способны утилизировать собственные органеллы, макромолекулы и патогены. Многие РНК-вирусы могут регулировать процесс аутофагии с целью изменения клеточной физиологии и метаболизма в инфицированных клетках, способствуя вирусной репликации и препятствуя активации дсРНК-зависимых защитных механизмов.

Данное исследование направлено на изучение роли аутофагии во внутриклеточном цикле вируса краснухи. Так, для того, чтобы оценить взаимосвязь процесса аутофагии и репликации вируса краснухи, эпителиальные клетки A549 заражали диким и аттенуированным штаммами вируса краснухи — C-77w и C-77a, соответственно, со множественностью заражения 1 инф.ед./кл, параллельно измеряли уровень экспрессии генов, участвующих в инициации и элонгации аутофагосомы и ее слиянии с лизосомой — Beclin1 (инициация аутофагии), Atg5 (элонгация), Rab7 (слияние с лизосомой с образованием аутофаголизосомы) и SQSTM1 (кодирующий белок p62, связывающий убиквитинированные белки и доставляющий их в аутофагосомы для расщепления). 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 белков Rab7 и SQSTM1 не наблюдали. Данный эффект коррелировал с более отсроченной ИФНб-опосредованной индукцией мРНК генов белков TRAIL и XAF1, приводящих к апоптотической гибели клеток, — через 96 часов после заражения. Таким образом, мы предполагаем, что процесс аутофагии был abortивным и не приводил к элиминации вируса, т.е. не выполнял своей защитной противовирусной функции.

Для подтверждения влияния аутофагии на репликацию вируса краснухи, мы измерили концентрацию вирусных частиц, а также РНК в супернатантах и внутриклеточно в присутствии ингибитора (BFLA) и индуктора (Rapamycin) аутофагии при заражении культуры клеток A549 вирусом краснухи через 24 часа после заражения. Аутофагия вносила существенный вклад в продукцию вирусных частиц клетками A549 во внутриклеточное пространство, что следует из увеличения их выхода в присутствии индуктора аутофагии и снижения — в присутствии ингибитора, при этом значимого эффекта на изменение концентрации вирусной РНК как в супернатантах, так и внутриклеточно не наблюдали.

Таким образом, вирус краснухи может использовать антивирусный механизм для предотвращения деградации и обеспечения своей репликации, дифференцированно регулируя процесс аутофагии, путем стимулирования инициации и подавления более поздних стадий.

Соавторы: А.В. Астапенко, Е.В. Прокофьева, Л.Р. Романцова, Ю.Р. Щетинина, Ю.И. Аммур

Иммунологические параметры грудного молока у женщин с различным состоянием здоровья в динамике лактации

Дементьева Юлия Назымовна

Ульяновский государственный университет, Кафедра педиатрии

Научные руководители:
д.м.н., профессор А.И. Кусельман
д.м.н. доцент А.П. Черданцев

Рекомендации ВОЗ направлены на всестороннюю поддержку грудного вскармливания. Тем не менее, остаются нерешенными вопросы сохранения длительной лактации у матерей, динамики изменений защитных факторов грудного молока в зависимости от состояния здоровья женщины.

Цель работы – изучить уровень иммуноглобулинов основных классов, лактоферрина в грудном молоке и периферической крови у женщин с различным состоянием здоровья в динамике лактации.

Материалы и методы: В исследование было включено 96 лактирующих женщин, отобранных методом простой рандомизации, которые подразделялись на группы: I группа (n=14) – контрольная, практически здоровые женщины с неосложненным течением данной беременности; II группа (n=42) – матери с осложненным акушерско-гинекологическим анамнезом (с наличием очагов хронической урогенитальной инфекции); III группа (n=40) – женщины, имеющие очаги хронической инфекции экстрагенитальной локализации.

Параметры IgA, sIgA, IgE, IgM, IgG, лактоферрина (ЛФ), интерлейкинов (ИЛ) 2, 4, 10 в грудном молоке и периферической крови определялись на 3-5 сутки после родов, в 1, 3 и 6 месяцев лактации стандартным методом иммуноферментного анализа (тест-системы ЗАО «Вектор-Бест») на базе иммунологической лаборатории ГУЗ Ульяновская областная детская клиническая больница (главный врач А.М. Лебедько).

Результаты работы и их обсуждение: Количество иммуноглобулинов основных классов в материнском молоке имеет сравнимые значения в группах наблюдения, вне зависимости от исходного состояния здоровья женщин, что предполагает возможность существования механизма биологического контроля за иммунологическим постоянством грудного молока.

Основное содержание в молоке имеет секреторный IgA, sIgA, а остальные классы- IgE, IgM, IgG составляют значительно меньшие концентрации, что указывает на то, что именно иммуноглобулины класса А определяют главные механизмы формирования иммунологической толерантности. Подтверждено, что с течением времени концентрации иммуноглобулинов постепенно падают, что указывает на то, что формирование иммунной системы ребенка после 6 месяцев жизни постепенно становится автономным. В нашей работе показано отсутствие достоверной разницы по уровню иммуноглобулинов в грудном молоке среди здоровых женщин и имевшие хронические экстрагенитальные и генитальные заболевания.

Уровень ЛФ грудного молока на 3-5 сутки после родов не имел достоверных отличий между группами ($p < 0,05$). В 1 и 6 месяце после родов в III группе уровень лактоферрина был статистически значимо выше по сравнению с другими группами. На 3 месяце лактации достоверных различий между группами не отмечалось ($p > 0,05$). В динамике лактации в I группе максимальный уровень ЛФ отмечался в родильном доме, в дальнейшем его значения снижались. Во II и III группах наблюдения уровни ЛФ на 3-5 сутки и в 1 месяц были сопоставимы ($p > 0,05$), к 6 месяцу лактации также от-

мечалось снижение показателей. Высокий уровень ЛФ грудного молока у женщин II и III групп в течение первых месяцев жизни, возможно, является приспособительным защитным механизмом от развития инфекций.

По нашим данным уровень ИЛ 10 грудного молока у женщин с наличием фоновых заболеваний на 1,3,6 месяце лактации не имеет достоверных различий в спонтанной и стимулированной продукции, что возможно свидетельствует о низких адаптационных возможностях макрофагов грудного молока. Достоверных различий показателя ИЛ-2 и ИЛ-4 между группами группами не отмечалось.

Таким образом, представленные данные указывают на собственную автономность синтеза грудного молока и определяют правильность подхода, что несмотря на заболевания матери, в частности хронические болезни, кормление грудным молоком очень эффективно для ребенка.

Вакцинация против пневмококковой инфекции и заболеваемость острыми респираторными инфекциями среди детей первых лет жизни

Елагина Татьяна Николаевна

*Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Кафедра эпидемиологии,
Лаборатория вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний*

Научные руководители:
д.м.н., профессор Н.Н. Филатов
д.м.н., профессор М.П. Костинов

Лидирующее место в общей структуре инфекционной заболеваемости среди детей неизменно занимают заболевания дыхательных путей и ЛОР-органов. Предупреждение ряда клинических форм бронхолегочной патологии и патологии ЛОР-органов возможно благодаря вакцинации против ПИ, которая проводится с 2014 года в рамках Национального календаря профилактических прививок детям первого года жизни.

Цель: Сравнить уровень заболеваемости острыми респираторными заболеваниями среди детей 2015 – 2017 года рождения, с учетом прививочного анамнеза, своевременности вакцинации и соблюдения схемы вакцинации против ПИ.

Материалы и методы: Данные получены с использованием первичной медицинской документации (учетная форма №112/у «История развития ребенка»).

Результаты: Уровень охвата двукратной вакцинацией на 01.01.2018 в декретированных возрастах составляет среди детей 6–12 месяцев 14,3%; 12–24 месяцев 4,5%; 24–36 месяцев 9,8%. Согласно календарю профилактических прививок ревакцинировано (имеют 3 прививки) 3,0% детей 12–24 месяцев. Однократно было вакцинировано 22,5% от подлежащих по возрасту детей 2015–2017 гг. рождения, а 30,8% детей получили по крайней мере одну прививку против ПИ.

Своевременно, т.е. до достижения 6 месяцев начали вакцинироваться 13,2%; 17,6% детей получили первую вакцинацию до достижения возраста 12 месяцев. 17,5% детей начали прививаться против ПИ в возрасте старше 1 года. Своевременно до 1 года жизни получили вторую вакцинацию 4,6% детей, в то время как 5,8% детей завершили курс вакцинации в возрасте старше 1 года. Согласно схеме вакцинации против ПИ Национального календаря своевременно, т.е. на втором году жизни ревакцинировано только 2% детей.

Пневмококковая инфекция является причиной ряда заболеваний, таких как менингит, сепсис, бактериемия, пневмония, бронхит, острый средний отит, синусит, конъюнктивит и пр. При изучении заболеваемости бронхолегочной патологией и патологией ЛОР-органов детей 2015–2017 годов рождения выявлено, что наибольший уровень заболеваемости отмечается на 2–3 году жизни.

На первом году жизни среди вакцинированных против ПИ однократно уровень заболеваемости ниже в 1,3 раз по сравнению с не привитыми детьми, среди привитых двукратно — в 2,7 раз. На втором году жизни среди вакцинированных против ПИ однократно уровень заболеваемости ниже в 2,1 раз по сравнению с не привитыми детьми, среди привитых двукратно — в 1,7 раз. На третьем году жизни среди вакцинированных против ПИ однократно уровень заболеваемости ниже в 1,9 раз по сравнению с не привитыми детьми, среди привитых двукратно — в 7,2 раз.

Назначение антибактериальной терапии при острых респираторных заболеваниях на первом году жизни требуется в 2,4 раза чаще среди не вакцинированных против ПИ детей; в 2,5 раз на втором году жизни; в 3,2 на третьем году жизни.

Стоит отметить, что случаи госпитализации по вопросу оказания медицинской помощи в связи с острыми респираторными заболеваниями, отмечались исключительно среди детей, не вакцинированных против ПИ, и наблюдались наиболее часто среди детей второго года жизни и первого года жизни.

Оценка некоторых параметров качества рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС)

Зими́на Екатерина Максимовна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория протективных антигенов

Научные руководители:
д.м.н. профессор Н.А. Михайлова
к.б.н. А.А. Калошин

На основе рекомбинантных белков наружной мембраны F (OprF) и анатоксина *P. aeruginosa* получены три опытные серии препарата рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС), содержащего в одной дозе 25 мкг рекомбинантного белка OprF и 50 мкг анатоксина, сорбированные на геле гидроксида алюминия.

Качество вакцинного препарата, в основном, оценивали по критериям, предусмотренным Государственной Фармакопеей XIII (ГФ 13) для иммунобиологических препаратов. Однако, такие параметры как подлинность сорбированной вакцины и контаминация рекомбинантных компонентов вакцины ДНК бактериальных клеток продуцентов требовали детального исследования.

Для определения подлинности компонентов и готового вакцинного препарата использован метод иммуноблотинга.

Рекомбинантные белки OprF и анатоксин специфически реагировали с кроличьими иммунными сыворотками: на нитроцеллюлозной бумаге присутствовали две полосы преципитации, соответствующие компонентам препарата, что свидетельствовало о подлинности компонентов вакцины.

Однако, проведение аналогичным способом проверки подлинности адсорбированного вакцинного препарата оказалось невозможным по причине связи рекомбинантных белков с адьювантом. Проведенный электрофорез сконцентрированной надосадочной жидкости показал отсутствие компонентов вакцины.

В связи с этим проведены исследования по отработке способа десорбции. Для десорбции рекомбинантных белков с адьюванта использовали цитратно-фосфатный буфер с разными значениями pH. Исследуемые образцы анализировали при помощи электрофореза и иммуноблотинга. Полученные результаты соответствовали данным исследования подлинности компонентов вакцины.

Для определения остаточной ДНК клеток штаммов-продуцентов в компонентах вакцины использовали метод Дот-гибридизации с применением биотин-меченных зондов. Принцип метода заключается в том, что анализируемый препарат наносили на нейлоновую мембрану. Фиксированную на мембране ДНК (в случае ее наличия) гибридизуют с ДНК-зондом, содержащим биотиновую метку. Биотин при связывании с авидином образует нерастворимый комплекс, выявляемый с помощью окрашенного субстрата. В исследуемых образцах рекомбинантных белков окрашенный комплекс не проявлялся, что свидетельствовало об отсутствии контаминации ДНК клеток штаммов-продуцентов.

Таким образом, в результате проведенных исследований подтверждена подлинность опытных серий рекомбинантной вакцины и показано отсутствие контаминации компонентов вакцины ДНК бактериальных клеток.

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

Соавторы: Н.А. Михайлова, А.В. Солдатенкова, А.А. Калошин

Особенности гуморального иммунного ответа (классы и субклассы антител, напряженность и продолжительность иммунитета) при иммунизации мышей препаратом белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*

Калиниченко Евгений Олегович

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория механизмов регуляции иммунитета

Научные руководители:
д.м.н. профессор Н.А. Михайлова
д.м.н. Н.К. Ахматова

В ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова проводятся исследования по разработке вакцины против *Pseudomonas aeruginosa* «РВС» на основе рекомбинантных белков OprF и анатоксина (делеционной формы экзотоксина А). Определен состав препарата и начаты доклинические исследования. Важным разделом этой работы является изучение иммунного ответа на вакцинацию, включая изучение спектра классов и субклассов вырабатываемых антител.

Цель настоящего исследования – изучить антительный спектр, напряженность и продолжительность иммунитета при иммунизации вакцинным препаратом на основе рекомбинантных белков *Pseudomonas aeruginosa* OprF и анатоксина, сорбированных на геле гидроксиде алюминия.

Вакцину «РВС» вводили беспородным мышам-самкам с весом 14-16 г внутривентриально в объеме 0,5 мл дважды с интервалом в 2 недели.

Методом иммуноферментного анализа исследовали содержание антител к белкам OprF и анатоксину классов IgM и IgG (суммарных и субклассов IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) в сыворотках иммунизированных и контрольных мышей. Отбирали кровь тотально через 3 недели после второй иммунизации в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Содержание антител исследовали в сыворотках 10 иммунизированных животных и в пулово́й сыворотке неиммунизированных мышей.

Продолжительность иммунитета определяли по содержанию суммарных антител к белкам-компонентам вакцины в сыворотках иммунизированных мышей. Для этого тотальный забор крови у 10 иммунизированных животных с получением сывороток производили через 2, 4, 8 и 12 недель после 2-й иммунизации. Для сравнения исследовали сыворотки 10 неиммунизированных (контрольных) животных.

Результаты: антитела класса IgM к белку OprF были выявлены в сыворотках иммунизированных мышей в титрах от 1:200 до 1:3200 (со средним 1:1420); у контрольных – в титре 1:100; к анатоксину – у иммунизированных – от 1:400 до 1:3200 (со средним 1480), у неиммунизированных – 1:200. Антитела класса IgG (суммарные): к белку OprF – у иммунизированных – от 1:3200 до 1:102400 (со средним 1:33600), у неиммунизированных – 1:100; к анатоксину – у иммунизированных от 1:6400 до 1:102400 (со средним 1:5840), у неиммунизированных – в титре 1:200.

Антитела субклассов IgG к обоим белкам в контрольных сыворотках не выявлялись в используемых разведениях (наименьшее – 1:100), за исключением антител класса IgG2b к анатоксину (1:200).

У иммунизированных мышей антитела субкласса IgG1 определялись в титрах 1:800-1:51200 к OprF (среднее значение 1:12240) и 1:800-1:102400 к анатоксину (среднее 1:33360); субкласса IgG2a – от 1:800 до 1:25600 к OprF (среднее 1:10560) и от 1:1600 до 1:51200 к анатоксину (среднее 1:15360); субкласса IgG2b – от 1:1600 до 1:25600 к OprF (среднее 1:11360) и от 1:1600 до 1:102400 к анатоксину

(среднее 1:19680); субкласса IgG3 – от 1:100 до 1:12800 к OprF (среднее 1:2730) и от разведения меньшего 1:100 до 1:6400 к анатоксину (среднее 1:1490).

В опыте по исследованию продолжительности иммунитета антитела к белку OprF были найдены: на сроке 2 недели – в титрах от 1:4000 до 1:32000 (среднее значение 1:14400); на сроке 4 недели – от 1:4000 до 1:32000 (среднее значение 1:12400); на сроке 8 недель – от 1:1000 до 1:8000 (среднее значение 1:4375); на сроке 12 недель – от 1:1000 до 1:4000 (среднее значение 1:2111). Антитела к анатоксину были найдены: на сроке 2 недели – в титрах от 1:2000 до 1:32000 (среднее значение 1:19000); на сроке 4 недели – от 1:1000 до 1:16000 (среднее значение 1:12900); на сроке 8 недель – от 1:1000 до 1:16000 (среднее значение 1:5900); на сроке 12 недель – от 1:1000 до 1:8000 (среднее значение 1:3400).

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что на введение вакцины «РВС» формируется гуморальный иммунный ответ, представленный антителами классов IgM (в незначительных титрах) и IgG (включая все субклассы с преобладанием IgG1).

В течение срока наблюдения (12 недель) у мышей сохранялся напряженный иммунитет к компонентам вакцины.

Характеристика изолятов вирусов гриппа, выделенных от пациентов с летальными исходами

Карташова Надежда Павловна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория экспериментальной вирусологии

Научный руководитель:
д.б.н. И.А. Ленева

Введение. Грипп является острым респираторным заболеванием, наносящим вред здоровью людей и приводящим к огромным экономическим потерям. По данным Росстата в эпидемиологическом сезоне 2015–2016 годах смертность составила 309 случаев. В 301 случае (97%) причиной смерти стал пандемический грипп А(Н1N1) pdm.

Целью работы было изучение чувствительности к противовирусным препаратам клинических изолятов вирусов гриппа, выделенных в 2015–2016 г., от пациентов с летальными исходами.

Материалы и методы. Выделение и накопление клинических изолятов из легких и бронхов пациентов, умерших от гриппозной инфекции на территории Российской Федерации, вызванной вирусом гриппа А/Калифорния/2009 (Н1N1) pdm, проводили в культуре клеток MDCK согласно общепринятому протоколу ВОЗ. Изучение чувствительности выделенных штаммов к субстанциям препаратов римантадин и умифеновир проводили в культуре клеток MDCK с использованием ИФА модифицированного для определения противовирусной активности веществ. Определение антинейраминидазной активности озельтамивира карбоксилата проводили методом флуоресценции с использованием субстрата 20-(4-methylumbelliferyl) - α -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) по протоколу ВОЗ. На основании полученных данных были построены кривые доза-эффект, из которых были определены ИК50 субстанций препаратов для каждого из изученных вирусов

Результаты. Из патологоанатомических материалов легких 5-ти и бронхов 4-х пациентов, умерших от лабораторно-подтвержденной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа А/Калифорния/2009 (Н1N1) pdm, выделены и накоплены вирусные изоляты и проведено изучение их чувствительности в опытах *in vitro* к лицензированным и широко используемым в России противогриппозным препаратам различного механизма действия. Римантадин, блокатор ионных каналов М2 белка, в изученных концентрациях от 1 до 20 мкг/мл не ингибировал вирусную репродукцию всех изученных изолятов из легких и бронхов 9 пациентов. Напротив, ИК50 ингибитора нейраминидазы - карбоксилата озельтамивира и ингибитора фузии - умифеновира для всех изолятов были в диапазоне 5-12,5 и 0,03-3000 нМ соответственно и входили в области значений ИК50 ранее определенных для различных штаммов вирусов гриппа, как чувствительных к этим препаратам.

Выводы. Клинические изоляты из материалов легких 5-ти и бронхов 4-х пациентов соответственно, умерших от лабораторно-подтвержденной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа А/Калифорния/2009 (Н1N1) pdm, были нечувствительны к препарату римантадин и обладали высокой чувствительностью к препаратам озельтамивир и умифеновир.

Соавторы: Е. Глубокова, И. Фалынскова, И.А. Ленева, Е.И. Бурцева, А.А. Поромов

Частота выявления мутаций в белке NS5a вируса гепатита С, ассоциированных с лекарственной резистентностью, среди ранее нелеченных пациентов

Кичатова Вера Сергеевна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория вирусных гепатитов

Научный руководитель:
д.б.н., профессор К.К. Кюреган

Введение. Вирус гепатита С (ВГС) - социально значимая инфекция, для которой отсутствует специфическая иммунопрофилактика. Благодаря препаратам прямого действия (ППД) последнего поколения, при лечении пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) удается достичь устойчивого вирусологического ответа (УВО) более чем в 95% случаев. Неудачи терапии, по-видимому, обусловлены сочетанием нескольких неблагоприятных факторов, одним из которых является феномен лекарственной резистентности ВГС. По некоторым данным, в 83% случаев отсутствия УВО, в участках генома вируса, кодирующих белки мишени для ППД, обнаруживались 1 или несколько аминокислотных замен, ассоциированных с лекарственной резистентностью (Resistance Associated Substitution, RAS). Наибольшее клиническое значение продемонстрировали RAS к ингибиторам белка NS5a ВГС (RAS NS5a). Данные о частоте встречаемости подобных мутаций среди популяции Российской Федерации (РФ) практически отсутствуют.

Цель исследования. Определение частоты встречаемости RAS NS5a среди пациентов, ранее не получавших противовирусную терапию ППД.

Материалы и методы. Проанализировано 202 последовательности амплифицированных участков генома ВГС, кодирующих белок NS5A: ВГС субтипа 1a (n=19), 1b (n=93) и 3a (n=90). РНК ВГС выделяли из сывороток крови пациентов, с клинически подтвержденным хроническим гепатитом С из Гепатологического центра Инфекционной больницы №1 г. Москвы (сбор материала в 2008-2011 гг.), а также от позитивных по анти-ВГС пациентов токсико-реанимационного отделения НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского (сбор материала в 2014 г.). Для анализа частоты встречаемости RAS NS5a были отобраны наиболее клинически значимые аминокислотные позиции (M28V, Q30R, A30K, L31M, Q54H/N/Y, H58D, Q62E, A92T, Y93H) для препаратов даклатасвир, ледипасвир, омбитасвир и элбасвир. Для образцов субтипа 1a (ВГС-1a) были построены филогенетические деревья на основе амплифицированных фрагментов белков core и NS5a ВГС.

Результаты. Мутации M28V и Q62E среди изолятов ВГС-1a встречались в 57,9% и 100% случаев соответственно, в то время как другие RAS выявлены не были. Филогенетический анализ последовательностей ВГС-1a показал, что 17 из 19 (89,5%) отечественных изолятов формируют единую монофилетическую группу, наиболее близкую к штаммам из США. Наиболее распространенными RAS для субтипа 1b оказались варианты L31M (5,5%), Q54H/N/Y (31,8%), и Y93H (5,5%), для субтипа 3a-A30K (4,8%) и Y93H (2,2%).

Выводы. Полученные результаты демонстрируют крайне высокую распространенность потенциально резистентных вариантов ВГС-1a в РФ. Большинство отечественных штаммов ВГС-1a оказались потомками одного случая заноса с территории США, что послужило причиной широкого распространения одних и полного отсутствия других RAS NS5A в российских последовательностях ВГС-1a («эффект основателя»). Среди наиболее распространенных на территории РФ субтипов 1b и 3a доля штаммов, несущих RAS NS5a, оказалась значительно ниже по сравнению с ВГС-1a, и в сред-

нем не превышает показателей, которые наблюдаются в других регионах мира. Представленные данные являются «нулевой точкой» в изучении RAS, поскольку получены до внедрения в широкую практику ППД при лечении ХГС и необходимы для последующего мониторинга возможного распространения таких мутаций на фоне широкого применения ингибиторов NS5A.

Соавторы: А.А. Карлсен, О.В. Исаева, С.А. Солонин, М.Г. Исагулянц, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов

Влияние состава питательной среды на продукцию капсульного полисахарида при культивировании *Streptococcus pneumoniae*

Козловцева Дарья Владимировна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория иммунохимической диагностики

Научный руководитель:
д.м.н. Н.Е. Ястребова

Единственным рекомендуемым Всемирной организацией здравоохранения способом предотвращения заболеваний, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, является иммунизация. Наиболее развитыми странами (США, Великобританией, Францией и др.) были разработаны и производятся вакцины, учитывающий серотиповой пейзаж присущий их территориям. Отличия серотипового пейзажа России от стран-производителей вакцин не позволяет эффективно бороться с заболеваниями, вызываемыми *S. pneumoniae*. Таким образом, разработка отечественной вакцины является одной из приоритетных задач по обеспечению здравоохранения в Российской Федерации.

Разработка вакцин против пневмококковой инфекции основана на иммуногенных свойствах капсульного полисахарида. Наиболее эффективным методом получения данного антигена является выделение его из культуральной жидкости. Учитывая, что для производства вакцин требуется большое количество капсульного полисахарида, необходимо, чтобы питательная среда способствовала высокой скорости роста пневмококка, синтезу капсульного полисахарида, а также не содержала компонентов, затрудняющих его очистку. В связи с этим целью настоящего исследования является изучение влияния состава питательной среды на способность *S. pneumoniae* синтезировать капсульный полисахарид.

Для проведения исследования были выбраны штаммы из наиболее актуальных для территории России серотипов *S. pneumoniae*: 3 (штамм № 10196), 19F (штаммы № 486 и 888) и 23F (штамм № 96521). Культивирование микроорганизмов проводили в статичных условиях в бактериологических пробирках, содержащих 30 мл питательной среды, с 5% подачей CO₂ при температуре 37 °С, дополнительно в аналогичных условиях было проведено культивирование штамма № 96521 серотипа 23F при больших объемах питательной среды (во флаконах – 300 мл, колбах – 6 и 8 литров). В качестве минеральной основы питательной среды были использованы основы: Ледерберга, Клейна и Франца. Для изучения ростовых характеристик *S. pneumoniae* в процессе культивирования проводился мониторинг оптической плотности методом спектрофотометрии. Одновременно методом ракетного иммуноэлектрофореза измерялось количество капсульного полисахарида в образцах культуральной жидкости.

Наиболее высокие показатели биомассы были получены в среде Ледерберга, поэтому для решения последующих задач по оптимизации питательной среды была выбрана эта солевая основа. С целью увеличения количества полисахарида, вырабатываемого *S. pneumoniae* был подобран оптимальный источник аминокислот. Выбор осуществлялся между соевым пептоном, аминокислотом и казеиновым пептоном. В качестве контроля был выбран сердечно - мозговой бульон.

В ходе исследования было установлено, что самые высокие темпы роста культуры и концентрация полисахарида регистрируются при культивировании в средах, источниками аминокислот в которых выступают соевый или казеиновый пептоны. Такие результаты были закономерны для всех изучаемых штаммов, при выращивании в бактериологических пробирках, содержащих 30 мл питательной среды.

Вместе с тем, при культивировании штамма № 96521 серотипа 23F во флаконах с объемом питательной среды 300 мл полученные значения биомассы и полисахарида, превышали более чем в 2 раза значения, полученные при культивировании в бактериологических пробирках. Аналогичная закономерность наблюдалась при выращивании в колбах объемом 6 и 8 литров. Таким образом, увеличение объема питательной среды влечет за собой увеличение выхода биомассы и полисахарида.

Основываясь на результатах исследования, для дальнейшего выращивания данных серотипов в условиях управляемого глубинного периодического культивирования в ферментере были выбраны питательные среды, в которых источниками аминокислот являются соевый или казеиновый пептоны.

Соавторы: С.И. Елкина, М.М. Токарская, С.А. Барановская, А.О. Смирнова

Проблема контаминации культур клеток животных реовирусами

Корчева Екатерина Романовна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория молекулярной вирусологии

Научный руководитель:
к.б.н. Е.Б. Файзулов

Введение. Культуры клеток животных являются продуцентами биологически-активных веществ и вирусов, входящих в состав многих медицинских лекарственных и иммунобиологических препаратов. Важным требованием, предъявляемым к культурам клеток, используемым при производстве лекарственных препаратов и вакцин, является отсутствие их контаминации различными вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами. Риск вирусной контаминации – особенность всех биотехнологических препаратов, получаемых из клеточных линий. В лабораторной и производственной практике источниками контаминации вирусами могут служить сама клеточная линия, фетальная бычья сыворотка (ФБС) или трипсин, получаемый из поджелудочной железы свиней. Безопасность данных препаратов в отношении вирусной контаминации может быть в высокой степени обеспечена применением программы тестирования на наличие вирусов, а также оценкой эффективности удаления и инактивации вируса в процессе производства.

Орторевовирусы млекопитающих относятся к семейству *Reoviridae*, подсемейству *Spinareovirinae*, роду *Orthoreovirus*. На момент открытия они не были ассоциированы ни с одним известным заболеванием человека, хотя и обнаруживались в дыхательных путях и желудочно-кишечном тракте. Данные вирусы широко распространены, подразделяются на три серотипа, и большинство взрослых людей имеют антитела ко всем трём серотипам. В большинстве случаев орторевовирусная инфекция протекает бессимптомно или вызывает заболевание в лёгкой форме, что подтверждено в исследованиях на добровольцах. Орторевовирусы относятся к зоонозным вирусам. Являясь безоболочечными, реовирусы отличаются высокой стабильностью и устойчивостью к физико-химическим воздействиям.

Материалы и методы. Ротавирусы группы А и орторевовирусы выращивали в перевиваемой культуре клеток почки обезьяны МА-104 в присутствии трипсина в среде ДМЕМ с гентамицином при 37°C в CO₂-инкубаторе. Активацию вируса проводили в течение 30 мин в питательной среде с трипсином (25 мкг/мл). Выявление ротавирусной и орторевовирусной РНК проводили методом ПЦР-РВ с видоспецифическими праймерами. Вирусную геномную РНК анализировали методом электрофореза в ПААГ по Laemmly. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили по Сенгеру в капиллярном секвенаторе. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили в программах MEGA-6 и BLAST.

Результаты. С целью изоляции ротавирусов клетки МА-104 инокулировали фекальными экстрактами от 12 детей с подтвержденной ротавирусной инфекцией. Проводили 10-12 пассажей в среде с трипсином. На 5-9 пассажах в культуре клеток МА-104 для 5 из 12 образцов проявились признаки ЦПД, которое стало выраженным при дальнейшем пассировании. ЦПД проявлялось в полном разрушении клеток на 2-3 сутки после инфицирования. Поскольку в процессе пассирования вируса концентрация ротавирусной РНК в большинстве образцов снизилась до предела чувствительности ПЦР, был сделан вывод, что причиной ЦПД была репродукция другого вируса. Экстракция хлороформом не влияла на способность вируса вызывать в культуре клеток ЦПД. Было проведено также два пассажа вируса без активации трипсином и в отсутствие трипсина в поддерживающей

среде. После второго пассажа без трипсина все контрольные и опытные образцы вирусов перестали вызывать ЦПД даже при длительном наблюдении за монослоем (5-7 дней). На электрофореграмме генные сегменты распределились по схеме 3:3:4, что соответствует электрофоретипу ортореовирусов. ПЦР-анализ с праймерами к ортореовирусу млекопитающих подтвердил наличие в исследуемых образцах высокой концентрации реовирусной РНК. Далее были определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена полимеразы размером 754 п.н. (сегмент 1). Нуклеотидные последовательности вирусов из всех 5 исследуемых образцов совпали на 100%, при этом BLAST-анализ показал их максимальное сходство с ортореовирусами млекопитающих (94% гомологии), выделенными от свиньи и человека. Это показывает, что реовирус-контаминант представлен одним штаммом, и позволяет предположить его попадание в культуру клеток из одного источника. Наиболее вероятные источники – ФБС, трипсин для субкультивирования, трипсин для активации ротавируса, сама культура клеток МА-104. Однако ПЦР-анализ этих материалов не выявил наличия в них реовирусной РНК, что может свидетельствовать об изначально низкой концентрации вируса. С целью более точного установления таксономической принадлежности вируса было построено филогенетическое древо, включающее представителей разных видов рода *Reovirus* и проведен «бутстрэп»-анализ.

Заключение. Ортореовирусы млекопитающих, в том числе КРС и свиней, являются вероятными контаминантами клеточных культур при их выращивании в присутствии трипсина. Поскольку описана ассоциация реовирусов с заболеваниями человека, представляется обязательным контроль клеточных культур и реактивов животного происхождения, используемых для производства лекарственных препаратов и вакцин, на наличие реовируса.

Соавторы: Д.В. Марков, О.А. Петруша, Е.Б. Файзулов

Подходы к усовершенствованию инактивированных вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом

Курашова Светлана Сергеевна

ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Лаборатория геморрагических лихорадок

Научный руководитель:
д.м.н. Т.К. Дзагурова

Актуальность. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – хантавирусная инфекция, занимающая ведущее место в структуре природно-очаговых инфекций в России. Более 95 % заболеваемости ГЛПС в РФ ассоциировано с вирусом Пуумала, остальные случаи вызываются на европейской территории вирусами Добrava/Белград, на Дальнем Востоке вирусами Хантаан и Сеул. В отсутствие этиотропного лечения, высока потребность в применении эффективных профилактических вакцин. К настоящему времени успешные испытания прошли лабораторные серии моно-, бивалентной и трехвалентной инактивированных формалином вакцин на основе вирусов Пуумала, Добrava/Белград и Хантаан. Усовершенствование технологии производства хантавирусных вакцин, способствующее усилению их иммуногенности, остается задачей высокой актуальности.

Цель. Оценить иммуногенность инактивированной формалином сорбированной на гидроокиси алюминия вакцины против ГЛПС с использованием в качестве дополнительных адъювантов липополисахарида, очищенного из оболочки *S. Флекснера* (ЛПС) и В-субъединиц термостабильного белка энтеротоксина (ТЛБ).

Материалы и методы. Влияние адъювантов ЛПС и ТЛБ испытывали в составе вакцины ГЛПС поливалентной сорбированной на гидроокиси алюминия (ВАК-ПВ). Сравнивали 3 варианта вакцинных препаратов: ВАК-ПВ, ВАК-ПВ +ЛПС и ВАК-ПВ +ТЛБ. Мыши Balb/C весом 20-25 г были распределены на 6 групп по 10 в каждой, включая 3 группы, иммунизируемые вариантами вакцинных препаратов, и 3 контрольные группы мышей, которым вводили ЛПС, ТЛБ и физиологический раствор. Вакцинные и контрольные препараты вводили в/м по 0,5 мл в бедро по схеме: 3 иммунизации с двухнедельным интервалом, забор крови осуществляли через 2 недели после второй и третьей иммунизации. Каждая проба сыворотки крови трехкратно исследована в реакции нейтрализации в культуре Vero E6. Результаты представлены в виде среднеарифметического значения титра нейтрализующих антител по 50% редукции числа фокусобразующих единиц (ФОЕ).

Результаты. Введение вакцинных препаратов мышам не сопровождалось какими-либо побочными эффектами, как местного, так и общего характера. После второй иммунизации вакцинными препаратами среднеарифметические титры нейтрализующих антител к вирусу Пуумала существенно не различались в испытываемых группах. После третьей иммунизации средний титр нейтрализующих антител к вирусу Пуумала в ответ на введение ВАК-ПВ +ЛПС втрое превышал таковой в ответ на введение ВАК-ПВ и ВАК-ПВ +ТЛБ.

Выводы. Полученные результаты указывают на достоверное увеличение выработки нейтрализующих антител к вирусу Пуумала в присутствии липополисахаридного адъюванта в составе инактивированной сорбированной вакцины, что является основанием для дальнейших исследований, в частности, по сравнительной адъювантной активности ЛПС и гидроокиси алюминия в составе хантавирусных вакцин.

Соавторы: Баловнева М.В., Егорова М.В.

Синтез и противоопухолевая активность азотсодержащих аналогов препарата Антрафуран

Литвинова Валерия Александровна

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, Лаборатория химической трансформации новых антибиотиков

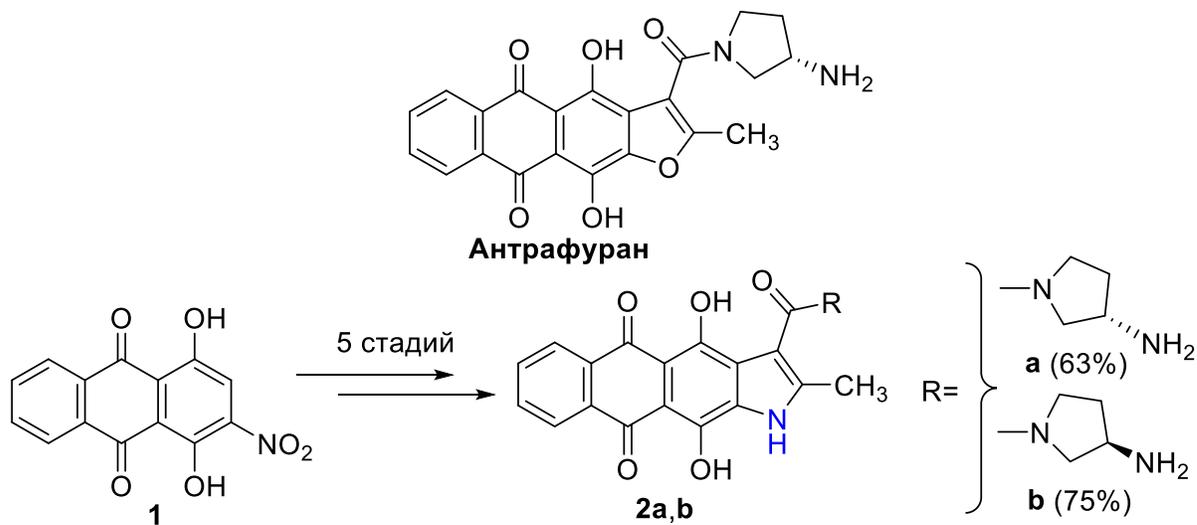
Научные руководители:

к.х.н. А.С. Тихомиров

д.х.н., профессор РАН А.Е. Щекотихин

Гетероарен-конденсированные производные антрацен-9,10-диона (гетаренантрахиноны) – перспективный класс для разработки новых противоопухолевых средств. В частности, среди производных антра[2,3-*b*]фуран-3-карбоксамиды было выявлено соединение-лидер Антрафуран (ЛХТА-2034), обладающие высокой противоопухолевой активностью, в том числе на моделях резистентных опухолей.

Поэтому для дальнейшего изучения закономерностей структура-активность в ряду соединений данного класса и изучения влияния гетероатома на цитотоксические свойства первоначально была разработана схема синтеза биоизостерных аналогов Антрафурана – *R*- и *S*-изомерные нафто[2,3-*f*]индол-3-карбоксамиды **2a,b**. Антипролиферативные свойства новых азотсодержащих соединений были протестированы (MTT-тест) в отношении линий опухолевых клеток человека Саран-1, NCI-H460, DND-41, HL-60, НСТ116, K562, а также резистентных сублиниях K562/4 и НСТ116р53КО.



Биологический скрининг показал, что карбоксамиды **2a,b** высокоэффективно подавляют рост большинства линий опухолевых клеток в интервале от низких микромолярных до субмикромолярных концентраций. Тестирование на модели лимфолейкоза P388 показало, что соединение **2a** обладает высокой противоопухолевой активностью, увеличивая продолжительность жизни мышей на 53% (5×20 мг/кг, в/б).

Разработка рекомбинантных полипептидов — аналогов диагностически значимых белков вируса Варицелла Зостер

Милованова Александра Владимировна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория генетики ДНК-содержащих вирусов

Научные руководители:

к.б.н. А.В. Сидоров

к.б.н. Г.И. Алаторцева

Вирус Варицелла Зостер (ВВЗ) является представителем семейства *Herpesviridae*, подсемейства *alpha-herpesvirinae*. Подобно другим представителям этого семейства, ВВЗ относится к нейротропным вирусам. Репликация вируса происходит как в кроветворных органах, так и в Т-клетках лимфоидной системы. У пациентов с нормальным иммунным статусом первичная инфекция проявляется в виде острого лихорадочного заболевания с характерными обильными высыпаниями – ветряной оспы. Затем инфекция переходит в латентную форму, при этом вирус остается в организме хозяина, локализуясь в ганглиях спинного мозга. В дальнейшем при снижении иммунитета с возрастом, при иммуносупрессивных состояниях в результате химиотерапии или терапии стероидами, а также при беременности может происходить реактивация вируса с проявлением болезненной сыпи по периферии нервных окончаний - опоясывающего герпеса, или герпеса Зостер. При первичной инфекции, а еще чаще при реактивации вируса наблюдаются неврологические, офтальмологические осложнения, поражения желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистой системы. Развитие опоясывающего лишая у молодых людей зачастую является «маркером» ВИЧ-инфекции.

Диагноз ВВЗ-инфекции главным образом устанавливается по наличию типичной клинической картины. Для лабораторной диагностики наиболее часто используются методы гемагглютинации, прямой иммунофлюоресценции, иммуноферментного анализа. Верификация диагноза обычно осуществляется с применением методов, основанных на ПЦР и генотипировании. Имеющиеся к настоящему времени тесты для серодиагностики герпеса зостер недостаточно специфичны вследствие наличия перекрестно-реагирующих антигенных детерминант у разных герпесвирусов. Учитывая этот факт, а также особую необходимость своевременной или корректной диагностики в случаях атипичного течения герпеса зостер, при котором возможны летальные исходы, можно заключить, что развитие методологии диагностики ВВЗ-инфекции является чрезвычайно важной задачей.

Известно, что наиболее диагностически значимым антигенами ВВЗ являются белки – продукты открытых рамок считывания (*orf*) вирусного генома: 1, 4, 14, 49 и 68. Белки – продукты генов *orf4*, *orf14* и *orf49* отвечают за образование IgM-антител при ветряной оспе, гликопротеин gE, кодируемый геном *orf68*, избирательно взаимодействует с IgG-антителами при ветряной оспе и опоясывающем лишае, не имея общих эпитопов с родственными герпесвирусами. Продукт гена *orf1* является антигеном, специфически реагирующим с IgG-антителами, образующимися при опоясывающем лишае. Несмотря на возможность использования перечисленных антигенов для дифференциальной диагностики стадий заболевания и динамики развития иммунного ответа, все имеющиеся на сегодня иммуноферментные тест-системы основаны на применении только рекомбинантного белка gE.

Цель работы заключается в получении рекомбинантных аналогов антигенов ВВЗ – продуктов генов *orf1*, *orf4*, *orf14*, *orf49* и *orf68* ВВЗ в бактериальной системе экспрессии для дальнейшего использования в диагностических целях. В качестве вирус-содержащего материала в экспериментах по

амплификации и клонированию использовали вакцинный штамм VarilRix. Фрагменты генов *orf1*, *orf4*, *orf14*, *orf49* и *orf68* ВВЗ, полученные методом ПЦР-амплификации, клонировали в плазмиду pGEMT-easy, а затем в плазмиду рЕХ с последующей трансформацией клеток штамма *E.coli* POP2136. Аутентичность нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов ДНК ВВЗ подтверждали секвенированием. На настоящий момент получен штамм *E.coli* -продуцент рекомбинантного белка ORF68 ВВЗ с достаточным уровнем экспрессии целевого белка, что подтверждено результатами анализа белкового состава бактериального лизата методами электрофореза и Вестерн-блоттинга.

Синтез и антибактериальные свойства катионных амидов эремомицина

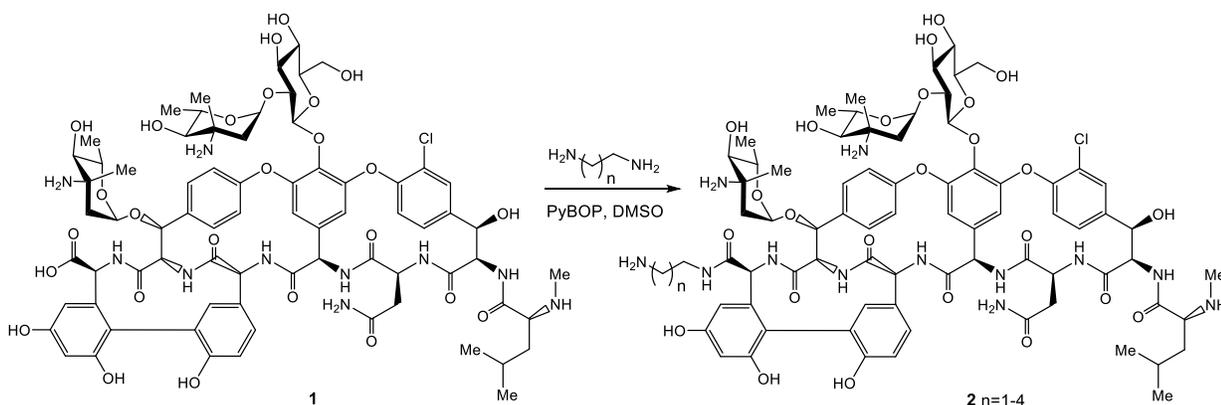
Моисеенко Елена Игоревна

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, Лаборатория химической трансформации новых антибиотиков

Научный руководитель:
д.х.н., профессор РАН А.Е. Щекотихин

Эремомицин — оригинальный отечественный гликопептидный антибиотик, открытый Г.Ф. Гаузе. Эремомицин обладает более высокой, чем ванкомицин, антибактериальной активностью, но малоактивен в отношении устойчивых штаммов стафилококков и энтерококков (GISA и VRE). В связи с этим актуальным остается поиск новых полусинтетических производных, активных в отношении резистентных патогенов.

На примере полусинтетических гликопептидов, одобренных для клинического применения (оритаванцин, телеванцин, далбаванцин), показано, что введение гидрофобных радикалов позволяет повысить их антибактериальную активность. За счет повышения аффинности к строительным блокам пептидогликана, высокую активность показали и катионные липогликопептиды. В этом ключе необходимо изучение влияния структуры катионной группы на активность производных эремомицина. Конденсацией эремомицина (1) с диаминоалканами в присутствии PyBOP в ДМСО получена серия новых производных эремомицина 2.



Для новых производных эремомицина 2 исследована антибактериальная активность на широкой панели чувствительных и резистентных штаммов грамположительных патогенов. Большинство полученных амидов эремомицина 2 имеют более высокую активность, чем исходный эремомицин (1), при этом показано, что структура вводимого остатка диаминоалкана играет ключевую роль в проявлении антибактериальной активности данным типом катионных гликопептидов.

Совершенствование методов синтеза и иммунохимической оценки гликоконъюгатов на основе САТ и капсульных полисахаридов *S. pneumoniae* серотипов 3 и 9N

Нуриев Ринат Ильшатovich

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория биоконъюгатов

Научный руководитель:
д.б.н. М.А. Буркин

Вопросы разработки и обновления профилактических препаратов в отношении *S. pneumoniae* остаются актуальными в связи со сменой спектра циркулирующих серотипов. Наши предыдущие эксперименты по синтезу и оценке иммунохимических характеристик конъюгатов столбнячного анатоксина (САТ) с капсульным полисахаридом *S. pneumoniae* серотипа 9N (Пс9N) позволили получить препарат с соотношением компонентов, обеспечивающим сохранность их антигенных свойств, высокую иммуногенность и протективный эффект. Титр анти-Пс9N антител при иммунизации мышей достигал 1:70000, ($p < 0.001$). Через 72 часа после интраназального заражения штаммом № 96420 *S. pneumoniae* 9N (10^7 /мышь) бактериальная обсемененность образцов легочной ткани иммунизированных конъюгатом мышей была в 10 раз меньше, чем в контрольной группе ($p > 0.05$). Несмотря на позитивные результаты, использованный метод модификации полисахарида адипиновым дигидразидом (АДГ) не исключал возможность возникновения внутримолекулярных сшивок, приводящих к изменению нативной структуры антигена и препятствующих дальнейшему конъюгированию с САТ. Исключить подобный исход возможно с помощью биоортогональных реакций, например, азид-алкинового циклоприсоединения. В связи с этим, в настоящей работе проводилось сравнение способов конъюгации. При этом особое внимание уделялось изучению сохранности нативной структуры полисахарида и САТ в зависимости от вида и степени их модификации. Данное исследование проводили в количественном конкурентном варианте ИФА соответствующих антигенов, нативные (исходные) формы которых служили референс образцами.

Полисахариды *S. pneumoniae* серотипов 9N и 3 были модифицированы АДГ и пропаргиламином (ПА) при их 10-, 100- и 1000-кратных мольных избытках. Обнаружено, что иммунохимическая активность Пс9N практически не изменялась при модификации АДГ или ПА, а производные Пс3, наоборот, распознавались антителами значительно хуже, пропорционально степени модификации. Эти данные объясняются, вероятно, тем, что в полисахаридной цепи Пс3 каждый второй сахаридный остаток потенциально подвергается дериватизации, тогда как в Пс9N вступать во взаимодействие может лишь каждый пятый моносахарид в цепи, что в меньшей мере видоизменяет его антигенные свойства (рис.1). Таким образом, каждый полисахаридный антиген требует индивидуально-го подхода, что необходимо учитывать при создании эффективных гликоконъюгатов вакцинного назначения.

Азидные производные САТ получали в результате взаимодействия с 3-азид-1-пропанаминном при его 10-, 30- и 100-кратных мольных избытках. Контрольные исследования показали, что иммунохимическое взаимодействие САТ с протективными моноклональными антителами не претерпело существенных изменений после модификации, что позволяет судить о сохранности значимых эпитопов.

Для дальнейшей оптимизации условий конъюгирования был выбран Пс3-ПА×10 (алкиновое производное Пс3, полученное при 10-кратном мольном избытке ПА) как препарат с наиболее сохран-

ной антигенной структурой. На основе Пс3-ПА×10 в реакции азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого ионами Cu (I), нами была получена серия конъюгатов САТ-Пс3. В экспериментах изучалось влияние количества используемого в реакции катализатора и времени проведения реакции на выход продукта. Показано, что увеличение концентрации Cu (I) в реакционной смеси с 0,05 до 1 мМ потенцирует выход САТ-Пс3, тогда как время проведения реакции (1-5-25 ч.) не влияет на полноценность образования конъюгата.

Иммунохимически сходные производные Пс9N-АДГ, полученные при 10-, 100- и 1000-кратных мольных избытках АДГ, использовались для конъюгирования с САТ в реакции карбодиимидной конденсации. При сравнительном изучении трех вариантов полученных конъюгатов САТ-Пс9N в сэндвич ИФА показано, что модификация Пс9N 100-кратным мольным избытком АДГ является достаточной для эффективного образования конъюгата и щадящей по отношению к протективным антигенным эпитопам.

Таким образом, в данной работе определены оптимальные параметры синтеза гликоконъюгатов на основе САТ и капсульных полисахаридов пневмококка серотипов 3 и 9N в реакциях азид-алкинового циклоприсоединения и карбодиимидной конденсации с адипиновым дигидразидом в качестве спейсера.

Полученные данные могут явиться основой для дальнейшего совершенствования конъюгатных противопневмококковых препаратов, а сохранность нативной структуры антигенов, подтвержденная предложенными иммунохимическими методами контроля, может служить характеристикой их эффективности.

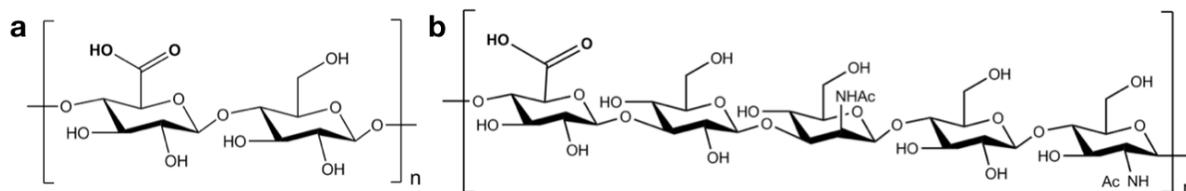


Рис. 1. Структурные формулы Пс3 (a) и Пс9N (b).

Соавторы: И.А. Гальвидис, М.А. Буркин

Исследование иммуногенной активности рекомбинантного пневмолизина

Петухова Екатерина Сергеевна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория терапевтических вакцин

Научный руководитель:
к.м.н. Д.С. Воробьев

Цель: изучение иммуногенной активности рекомбинантного пневмолизина (rPly).

Streptococcus pneumoniae является возбудителем инвазивных и неинвазивных заболеваний. Существующие полисахаридные и конъюгированные вакцины обеспечивают строгий серотипспецифический иммунный ответ к пневмококку, создавая предпосылки для серозамещения штаммов патогена. Исследователи рассматривают возможность разработки новых вакцин на основе белков пневмококка, так как они обладают внутривидовой перекрестной активностью. Пневмолизин — внутриклеточный белок пневмококка, частично секретируемый во внешнюю среду, являющийся одним из ключевых факторов патогенности *S.pneumoniae*, рассматривается как перспективный кандидат в составе пневмококковой вакцины.

Рекомбинантный пневмолизин получен в НИИВС им. И.И. Мечникова Воробьевым Д.С. и Сидоровым А.В.

Для получения иммунных сывороток мышей иммунизировали интраперитонеально rPly по схеме. При исследовании пуловой сыворотки животных, иммунизированных двукратно с интервалом в неделю, отмечалось достоверное повышение антител субизотипа IgG1 по сравнению с сывороткой мышей контрольной группы. Специфичность антител изучалась в опыте торможения, в котором определили конкурентное взаимодействие антител с растворимым белком. Торможение отмечалось на уровне 58%. При трехкратной иммунизации мышей через 2 недели после 2-й и 3-й иммунизации у каждой мыши определяли антитела субизотипа IgG1 к rPly методом ИФА. При изучении титров антител IgG1 к rPly в сыворотках мышей показано следующее: в группе животных, иммунизированных rPly после второй иммунизации достоверного увеличения титра антител не выявлено, в то время как после третьей иммунизации у мышей в этих группах регистрировали достоверное увеличение титра антител от 4 до 16 раз.

Рекомбинантный пневмолизин вызывает выработку антител класса IgG₁ в опыте на мышах. Оптимальная схема иммунизации — трехкратная, т.к. после 3-ей иммунизации отмечается нарастание титра антител. Требуется дальнейшее изучение протективной активности rPly в опыте активной и пассивной защиты.

Получение специфических антител для сэндвич-метода определения Core белка вируса гепатита С

Печелюлько Анастасия Александровна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория диагностики вирусных инфекций

Научный руководитель:
д.б.н. А.Д. Дмитриев

Введение. Вирус гепатита С (HCV) – это системное заболевание, характеризующееся поражением лимфоидной и нелимфоидной ткани, в том числе гепатоцитов, и клинически протекающее преимущественно в хронической форме с развитием цирроза печени. Острая, клинически выраженная (желтушная) форма вирусного гепатита С, встречается примерно в 20% случаев. Из числа заболевших самовыздоровление наступает в среднем в 15% случаев, а у остальной части пациентов (85%) заболевание принимает многолетнее латентное или малосимптомное течение, большей частью остающееся нераспознанным.

HCV является РНК-содержащим вирусом. Нуклеокапсид HCV окружен липопротеиновой оболочкой, в состав которой входят гликопротеины E1 и E2. Капсид вируса содержит структурный белок сердцевины (CoreAg), а также неструктурные белки NS2, NS3, NS4A, NS4. CoreAg обнаруживается в сыворотке крови через несколько дней после инфицирования, задолго до появления специфических антител, что позволяет диагностировать острый гепатит С на ранних стадиях. В настоящее время используются комбинированные наборы реагентов, выявляющие anti-HCV IgG и CoreAg HCV (HcAg) одновременно.

Настоящая работа заключается в получении антител для конструирования сэндвич-метода определения CoreAg вируса гепатита С как компонента иммуноферментной тест-системы определения HCV-инфекции. Основными этапами работы стали выделение агрегатов рекомбинантного CoreAg (с чистотой $\geq 90\%$), иммунизация животных, получение панели специфических моноклональных и поликлональных антител, а также их очистка и оптимизация условий адсорбции на твердую фазу.

Материалы и методы. Были исследованы 24 клонa *Pichia pastoris*, с различным уровнем экспрессии HcAg, предоставленные ИБФН им. Г. К. Скрыбина РАН. Core белок высаливали сульфатом аммония, ренатурацию проводили путём гель-фильтрации против PBS. Степень чистоты HcAg оценивали с помощью SDS-электрофореза в ПААГ, а долю агрегатов – ВЭЖХ. Массовая доля агрегатов в растворе составляла около 70%.

После 5-кратной иммунизации мышей BALB/c были получены гибридомы-продуценты моноклональных антител к HcAg. Гибридомы получали методом Келлера и Мильштейна. Продуцируемые ими антитела очищали из асцитной жидкости с помощью ионообменной хроматографии. Также в результате серии иммунизаций HcAg были получены поликлональные куриные антитела. Их выделяли из желтков яиц и очищали с помощью аффинной хроматографии.

Эффективность полученных антител оценивали в экспериментах по связыванию с иммобилизованным и меченым антигеном. В качестве контроля использовали компоненты набора «DS – EIA – HCV - AG» НПО «Диагностические системы».

Выводы. В результате работы были получены мышинные моноклональные и куриные поликлональные антитела, которые не уступали контрольным в опытах по связыванию как с меченым, так и с иммобилизованным на твердую фазу антигеном.

Соавторы: Ю.Н. Тараканова

Подбор сорбента для очистки концентрата полиовируса методом гель-фильтрации

Пиняева Анастасия Николаевна

ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Лаборатория биохимии

Научный руководитель:
к.б.н. А.П. Гмыль

В настоящее время мир вплотную подошел к глобальной сертификации ликвидации полиомиелита. Однако, источником появления новых циркулирующих штаммов полиовирусов является применяемая оральная полиовирусная вакцина (ОПВ). По этой причине, одной из самых значимых задач является окончательный отказ от использования всех видов ОПВ и переход к инактивированной вакцине из аттенуированных штаммов Сэбина (сИПВ).

Процесс производства сИПВ включает следующие этапы: 1) размножение вируса на перевиваемой линии клеток Vero; 2) очистка вируса от клеточного дебриса (методом фильтрации) и концентрирование (методом ультрафильтрации), 3) два последовательных этапа хроматографической очистки: гель-фильтрация и ионообменная хроматография; 4) инактивация вируса формалином. Хроматографическая очистка является одним из ключевых этапов производства вакцины, определяющих качество препарата.

Целью настоящего исследования был выбор коммерческого сорбента для первой стадии хроматографической очистки – гель-фильтрации. Были исследованы сорбенты: Sepharose 6 FF, Sephacryl S-1000, Sephacryl S-400 HR и Sephacryl S-300 HR. Гель-фильтрацию проводили на хроматографах АКТАpurifier и АКТАpure 150M с использованием колонок HiScale 26/40, упакованных выбранными сорбентами. Оценка эффективности очистки концентрата полиовируса проводилась по двум основным показателям: концентрация D-антигена (основного показателя потенциальной способности вакцины индуцировать защитный иммунитет, вирус нейтрализующие антитела, у вакцинированных лиц) в целевом пике и чистоте целевой фракции (присутствие невирусного белка). Дополнительно, в ходе хроматографического разделения также определяли содержание вирусной РНК, титр вируса и присутствие структурного белка VP2.

Результаты: При очистке концентрата на сорбенте Sephacryl S-1000 вирус-содержащий пик совпадал с пиком балластных белков. Таким образом, данный сорбент не подходит для нашей цели. На сорбентах Sepharose 6 FF, Sephacryl S-400 HR и Sephacryl S-300 HR были получены сопоставимые результаты по степени очистки вируса от балластных белков (93, 94 и 91% соответственно). Однако, в сравнении, с вирусом очищенном на Sephacryl S-400 HR и Sepharose 6 FF, выход и концентрация D-антигена в целевой фракции на сорбенте Sephacryl S-300 HR была значительно выше.

Заключение: Очистка полиовируса на сорбенте Sephacryl S-300 HR позволяет получать очищенный препарат с выходом D-антигена более 70%, концентрацией обеспечивающей иммуногенность и степенью очистки более 90%. Таким образом, данный сорбент является наиболее перспективным для использования на первой стадии хроматографической очистки полиовируса.

Соавторы: Ковпак А.А.

Воздействие антибактериальных веществ на рост и развитие биопленок клинических

Пиядина Анастасия Юрьевна

НИИВС им. И.И. Мечникова, ГНЦК им. А.Н. Рыжих

Научный руководитель:
к.б.н. М.А. Сухина

Большинство бактерий существуют в форме биопленок — специфически организованных сообществ, где клетки находятся в белковом матриксе, который не позволяет воздействовать антибиотикам на бактерии. В настоящее время ведутся активные исследования по изучению свойств бактериальных биопленок, способов ингибирования образования биопленок или их разрушения. В настоящей работе показано подавляющее воздействие фильтратов лактобацилл (содержащих бактериоцины) на бактериальные биопленки, образованные клинически значимыми бактериями.

Цель исследования. Изучить влияние активных внеклеточных веществ лактобацилл и противомикробных агентов на процессы ингибирования и разрушения биопленок.

Материалы и методы. При поиске способов ингибирования процесса образования биопленок использовали микроорганизмы, которые были выделены из гемокультуры и других клинических образцов пациентов. Научный интерес представляли следующие штаммы: *Escherichia coli* 317, *Klebsiella pneumoniae* 458, *Pseudomonas aeruginosa* 1000, *Acinetobacter baumannii* 480. В качестве ингибирующих факторов были выбраны: АНД 2000® — EXPRESS (кожный антисептик), фильтрат лактобацилл, в котором находилось протимомикробное вещество — бактериоцин, обладающее антагонистическими свойствами против других микроорганизмов. Для выявления воздействия этих факторов на процесс формирования биопленок готовили клеточные суспензии четырех исследуемых культур с плотностью бактериальной взвеси 1МсF. Затем смешивали 1 мл клеточной суспензии с 1 мл каждого из 3-х выбранных факторов. После чего полученные суспензии наносили на покровные стекла для биопленкообразования и микроскопировали. В качестве контролей были приготовлены планктонные суспензии клеток.

Отличие процесса разрушения биопленок от ингибирования биопленкообразования заключается в том, что антимикробные агенты влияют на уже сформированную бактериальную пленку, которая, как известно, обладает высокой устойчивостью к механическим и химическим факторам, а значит, антибактериальные агенты эффективны при ингибировании еще не сформировавшейся биопленки могут иметь более низкие показатели или не обнаружить своего положительного воздействия в случае с микроорганизмами, заключенными в матрикс биопленки.

Результаты. Оценка биопленкообразования проводилась по 5-ти бальной шкале. Исследуемые штаммы без воздействия ингибирующих факторов формируют биопленки на 2-3 уровне. После воздействия выбранных агентов процесс биофильмогенеза соответствовал 1 уровню в 95% случаев, в остальных образцах - степень формирования биопленок была ниже. Кожный антисептик проявлял лишь ингибирующее действие на процесс формирования биопленок, в то время как на планктонную форму клеток оказывал бактерицидный эффект. При воздействии на уже сформированные биопленки антибактериальный эффект был ниже по сравнению с ингибированием биопленки на начальной стадии ее образования. Тем не менее, процесс разрушения биопленки наблюдался в 90% случаев и достигал 1 стадии биопленкообразования. Достоверных различий действия фильтратов

различных штаммов лактобактерий на ингибирование образования биопленок нами не были выявлены.

Выводы. Фильтраты лактобактерий обладают высокой ингибирующей активностью в отношении биопленок, образованных клинически значимыми бактериями. Способность лактобактерий подавлять рост биопленок может быть перспективной для разработки новых лекарственных препаратов для борьбы с инфекциями, ассоциированными с бактериальными пленками.

Соавторы: М.А. Сухина

Детекция вирусов группы *Jingmenvirus* в клещах, собранных на территории РФ

Полиенко Александра Евгеньевна

ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Лаборатория биологии арбовирусов

Научный руководитель:
к.б.н. А.С. Климентов

Группа *Jingmenvirus* объединяет вирусы, геном которых представлен 4 (иногда 5) сегментами одноцепочечной РНК положительной полярности. Интерес представляет тот факт, что два сегмента имеют высокую степень гомологии с неструктурными белками флавивирусов – полимеразой и хеликазой-протеазой, а остальные сегменты кодируют структурные белки, не имеющие известных гомологов. В настоящее время к группе *Jingmenvirus* относят 10 вирусов (*Jingmen tick virus*, *Toxocara canis larva agent*, *Mogiana-tick virus*, *Charvil virus*, *Guaico Culex virus*, *Wuhan aphid virus 1,2*, *Wuhan cricket virus*, *Wuhan flea virus*, *Shuangao insect virus 7*). *Jingmen tick virus* – прототипный представитель данной группы – был выделен в 2010 году из пула клещей *Rhipicephalus microplus* в Китае.

В рамках нашей работы проведен скрининг суспензий клещей, собранных в Челябинской, Ульяновской, Архангельской областях и в республике Тыва, с помощью универсальной ОТ-ПЦР системы для детекции вирусов рода *Flavivirus*.

Всего обследовано 2605 клещей (*Dermacentor*, *Ixodes*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*), объединенных в 392 пула.

С помощью тест-системы, детектирующей фрагмент последовательности, кодирующей белок NS5 (РНК-зависимая РНК-полимераза), получено 8 положительных пулов клещей *Ixodes persulcatus*, собранных в Челябинской области в 2014 г., 1 положительный пул клещей *Dermacentor nuttalli*, собранных в республике Тыва в 2014 г., и 1 положительный пул клещей *Hyalomma marginatum*, собранных в Астраханской области в 2017 г. Для всех положительных образцов определены нуклеотидные последовательности ампликонов, полученных в ОТ-ПЦР. На нуклеотидном уровне полученные последовательности фрагмента гена полимеразы продемонстрировали наибольшее сходство с сегментом 1, представляющим собой флавиподобный белок NS5, вируса *Jingmen tick*.

В результате работы впервые показано широкое распространение вирусов группы *Jingmenvirus* на территории РФ.

Соавторы: В.П. Волок, Яковлев А.С.

Функциональные механизмы онколитической активности вируса кори в отношении клеток меланомы человека

Прокофьева Елена Викторовна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория экспериментальной иммунологии

Научный руководитель:
к.б.н. Ю.И. Аммур

Онколитическая виротерапия является перспективным подходом для лечения злокачественных неоплазий человека. Предполагают различные механизмы чувствительности неопластических, но не нормальных клеток, по отношению к онколитическим вирусам.

Цель работы заключалась в установлении параметров, определяющих чувствительность клеток меланомы человека к вакцинному штамму вируса кори Ленинград-16 (ВК). Для оценки специфичности воздействия вируса на клетки меланомы *in vitro* были исследованы клеточные линии метастатической меланомы человека (Mel II, Mel Ibr, Mel Mtp, Mel Z и Mel Kor) с гиперактивированным RAS/RAF1/MEK/ERK сигнальным путем и клетки фибробластов человека, использованные в качестве контроля.

Клеточные линии заражали ВК с различной множественностью заражения, динамику вирусной репродукции и оценку гибели клеток отслеживали через 3 – 120 часов после заражения. Экспрессию белков на поверхности клеток определяли проточной цитометрией. Исследованные клеточные линии чувствительны и перmissive для ВК. Эффективная репликация ВК приводила к гибели клеток меланомы, однако действие вируса по-разному проявлялось в различных клеточных линиях. Все клеточные линии меланомы, в отличие от нормальных фибробластов, экспрессировали на своей поверхности белки CD46 (17 – 94 %), являющиеся рецепторами для вакцинных штаммов ВК.

Иммунный ответ клеток меланомы на MV-инфекцию проанализирован по экспрессии мРНК ключевых генов, продукты которых участвуют в индуцированной интерфероном элиминации вируса. Три клеточные линии, Mel II, Mel Mtp и нормальные фибробласты, экспрессировали ИФН- β , но не ИФН- α , в ответ на вирусное заражение. ИФН- β индуцирует различные конформационные изменения в IFNAR1 с большим влиянием на индукцию экспрессии ИФН-стимулируемых генов (ISGs). В исследуемых культурах увеличение экспрессии гена IFNAR1 наблюдали только для нормальных фибробластов. Стабильность транскрипта мРНК ИФН- β во время заражения некоторыми вирусами зависит от активности протеинкиназы R (PKR), предотвращающей деаденилирование транскрипта ИФН- β . В нашем исследовании только культура клеток Mel II индуцировала экспрессию гена PKR в ответ на вирусное заражение. Для этой же культуры была характерна индукция экспрессии OAS1, MxA и некоторых др. ISGs, так или иначе участвующих в инактивации и элиминации вируса из зараженной клетки. При этом для трех других культур была характерна избирательность экспрессии ISGs. Культура клеток Mel Ibr экспрессировала в значительной степени мРНК MxA и TRAIL в ответ на вирусное заражение, Mel Z – OAS1, TRAIL и XAF-1, а Mel Mtp – OAS1, G1P3 и STAT1. Выявлено, что репликативная и онколитическая активность вируса зависит от паттерна экспрессии генов интерферонового ответа в клетках культуры. Ни в одной клеточной линии меланомы не наблюдали индукции экспрессии всего спектра генов, необходимых для ингибирования репродукции вируса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень экспрессии белков-рецепторов на поверхности клеток вместе с дефектами в ответе ИФН 1 типа на вирусное заражение являются определяющими факторами, опосредующими чувствительность меланом человека к ВК.

Соавторы: Ю.Р. Щетинина, А.В. Астапенко, Л.Р. Романцова, Ю.И. Аммур

Катамнестическое наблюдение за переносимостью бустерной ревакцинации против коклюша у детей-подростков

Пруцкова Екатерина Владимировна

*НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний
Ульяновский государственный университет, Кафедра педиатрии ИМЭ и ФК*

Научные руководители:
д.м.н., профессор М.П. Костинов
д.м.н., профессор А.П. Черданцев

Введение. Коклюш остается причиной озабоченности национальных служб здравоохранения даже в странах с высоким уровнем вакцинации. Первичная иммунизация эффективно защищает младенцев, но бессильна в профилактике инфекции в школьном возрасте. Известно, что противококлюшный иммунитет, полученный во младенчестве после календарной вакцинации ослабевает к 5-6 годам жизни, что способствует неуклонному росту инфекции среди подростков (до 40%) и взрослых. Всё это значительно усугубляет эпидемиологическую обстановку. Радикальное изменение ситуации лежит в бустерной ревакцинации ацеллюлярным коклюшным препаратом. Данная корректировка внесена в национальные календари вакцинации США и ряда стран ЕС. Календарь прививок Российской Федерации в силу отсутствия приемлемой национальной вакцины, не поддерживает указаний по ревакцинацию старших возрастных групп от коклюша,

Цель исследования. Провести сравнительный анализ клинической переносимости и состояния гуморального иммунитета после ревакцинации против коклюша детей-подростков.

Материалы и методы исследования. Было проведено наблюдение за подростками в возрасте 14-15 лет: I группа - получившие бесклеточную поликомпонентную вакцину против коклюша в составе комбинированного препарата (n=29), II группа - прошедшие стандартную ревакцинацию против дифтерии и столбняка АДС-М препаратом (n=27). Клиническое наблюдение осуществлено с помощью анкетированных карт в течение 30 дней с момента вакцинации. Определяли уровень сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G, Е реактивами АО «Вектор-Бест», в динамике до, через 1 и 6 месяцев после вакцинации. Провели эпидемиологический контроль частоты респираторных заболеваний у 25 вакцинированных, в катамнезе 12 месяцев после прививки.

Результаты. Нежелательные реакции: локальная гиперемия была зарегистрирована у 14 испытуемых (48%) и фебрильная температура – у 2 (11%), продолжительностью 3-4 дня регистрировались преимущественно в I группе. Аналогичные события во II группе выявлялись у 2 подростков (6%). Уровень иммуноглобулинов класса А в обеих клинических группах как до вакцинации ($2,92 \pm 0,3$ г/л – I гр.; $2,80 \pm 0,32$ – II гр.), так и после прививки ($2,69 \pm 0,35$ – I гр.; $2,67 \pm 0,34$ г/л – II гр.) соответствовал нормальным значениям и не имел достоверных различий. Аналогичная картина наблюдалась и при изучении концентрации сывороточных иммуноглобулинов классов G и M ($p > 0,05$). В группе подростков, получивших комбинированную коклюшно-дифтерийно-столбнячную вакцину, в сравнительном аспекте выявлялся незначительный прирост средних значений IgE ($42,66 \pm 13,75$ МЕ/л - до вакцинации, и $79,79 \pm 42,79$ МЕ/л – через 1 месяц после прививки), что в целом также не превышал нормативных значений.

В среднем, общая заболеваемость среди испытуемых составляла 1,45 случая в год до ревакцинации и 0,56 в течение года после прививки. При распределении общей заболеваемости по группам

наблюдения данный показатель был примерно сопоставимым: снижение частоты ОРЗ с 1,38 до 0,42 в I группе, и с 1,28 до 0,5 во II группе.

Заключение. Высокая частота встречаемости местных и общих поствакцинальных реакций (1/2 привитых) при использовании в качестве ревакцинации стандартной двухкомпонентной ацеллюлярной коклюшной и полнодозовой дифтерийно-столбнячной вакцины показывает её условную реактогенность, что определяет ограничение её применения в массовой иммунизации у детей старшего возраста, однако возможно введение данного препарата в индивидуальном порядке. Динамика уровня основных классов иммуноглобулинов показывает, что контрольные препараты имеют схожее влияние на итоговую гуморальную реакцию. Снижение частоты заболеваемости респираторными инфекциями внутри групп не является достоверной из-за малой выборки испытуемых, прошедших годичный этап наблюдения, но замеченная тенденция возможна в результате общей неспецифической активации гуморального иммунитета.

Выделение актиномицетов – потенциальных продуцентов антибиотиков с применением сока *Aloe arborescens*

Синёва Ольга Николаевна

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, Лаборатория таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов

Научные руководители:
д.б.н., профессор Л.П. Терехова

В связи с увеличением количества резистентных форм микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний, все более актуальной становится проблема поиска новых антибиотиков. Актиномицеты – обширная группа грамположительных мицелиальных бактерий, принадлежащая к филуму *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales*. Актиномицеты являются продуцентами биологически активных соединений, среди которых выделены вещества, обладающие антибактериальным, антигрибковым, противоопухолевым действием, и соединения, подавляющие развитие возбудителей паразитарных заболеваний. Изучено более 16000 антибиотиков микробного происхождения, продуцентами более 50% из них являются актиномицеты. Около 74% антибиотиков актиномицетного происхождения выделено из рода *Streptomyces*, остальная часть – из представителей редких родов (*Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Saccharopolyspora*, *Streptoverticillium*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, *Actinotadura*).

Для выделения актиномицетов из мест их естественного обитания широко применяются методы селективной изоляции. Эти методы основаны на различиях в питательных потребностях, физиологических свойствах, спектрах чувствительности к антибиотикам и другим ингибиторам роста у разных групп микроорганизмов.

Для изоляции актиномицетов в среды добавляют антибиотики, которые подавляют рост грибов и быстрорастущих немиелиальных бактерий. Антибиотики используют и в качестве селективных агентов для выделения определенных групп актиномицетов. Широко применяют обработку природных образцов химическими веществами (фенол, хлоргексидин, карбонат кальция и др.). Химические вещества часто применяются в комплексе с антибиотиками, что позволяет увеличить количество выделяемых культур актиномицетов. Стимулирующий эффект на прорастание спор микроорганизмов данной группы оказывает действие магнитных полей различной мощности, УФ и КВЧ облучение. Существуют методы выделения с помощью веществ животного и растительного происхождения. Было показано, что добавление в питательную среду веществ из группы катехоламинов (адреналин) и ауксинов (гетероауксин) для активации прорастания спор, существенно увеличивает долю выросших актиномицетов.

Сок и листья алоэ древовидного содержат эфирные масла, около 20 аминокислот, витамины В, С, Е, бета-каротин, клетчатку и другие питательные ферменты и микроэлементы, кроме того сок алоэ обладает бактерицидным и регенерирующим действием. В наших исследованиях было показано, что предварительная обработка в течение 10 минут и 1 часа почвенных суспензий соком алоэ в концентрациях 10% и 50% приводила к увеличению доли выросших актиномицетов в опытных вариантах по сравнению с контролем (от 11% до 44%), в том числе возрастала и доля выросших колоний редких родов актиномицетов. Всего в ходе работы в чистую культуру было выделено 527 штаммов актиномицетов.

Выделенные культуры были проверены на антибиотическую активность (методом перпендикулярных штрихов) в отношении тест-микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P),

Staphylococcus aureus ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042. Результаты показали, что 369 штаммов были активны в отношении Гр⁺ тест-организмов, 79 штаммов актиномицетов были активны в отношении Гр⁺ и Гр⁻ тест-организмов, 52 штамма актиномицетов проявляли активность в отношении *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042.

Нами было отмечено, что при добавлении сока алоэ в почвенные суспензии, на чашках Петри с питательными средами практически отсутствовал рост немикелиальных бактерий и грибных колоний, что значительно облегчило выделение актиномицетов. Отсутствие роста одноклеточных бактерий и грибов, вероятно, связано с бактерицидным действием сока алоэ.

Для сравнения действия свежесобранного сока алоэ и медицинского препарата «Алоэ экстракт жидкий» ЗАО «ВИФИТЕХ» был проведен эксперимент, в котором почвенные суспензии обрабатывались данным препаратом в концентрациях 30% и 50% в течение 10 минут и 1 часа. Полученные результаты показали, что достоверных различий между контролем и опытными образцами нет. Во всех вариантах опыта на чашках Петри с питательной средой обнаруживался рост грибных колоний и немикелиальных бактерий, что затрудняло выделение актиномицетов в чистую культуру. Всего в чистую культуру было выделено 79 штаммов актиномицетов. Выделенные актиномицеты были проверены на антибиотическую активность в отношении тест-организмов: 22 штамма были активны в отношении Гр⁺ тест-организмов, 9 штаммов актиномицетов были активны в отношении Гр⁺ и Гр⁻ тест-организмов, 5 штаммов в отношении *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042.

Создание регрессионной модели параметров культивирования *Streptococcus pneumoniae* в полусинтетической питательной среде

Смирнова Анастасия Олеговна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория иммунохимической диагностики

Научный руководитель:
д.м.н. Н.Е. Ястребова

В последние годы во многих странах наблюдается рост числа различных форм заболеваний, вызываемых пневмококками. В связи с этим ведутся активные разработки профилактических препаратов против инфекций, вызываемых этим микроорганизмом. В России зарегистрированы полисахаридная и конъюгированные вакцины, однако серотиповой состав применяемых вакцин не соответствует серотиповому пейзажу штаммов, циркулирующих на территории нашей страны. В настоящее время в институте разрабатывается вакцина на основе капсульных полисахаридов и поверхностных белков пневмококка. Важной стадией производства таких препаратов будет наработка протективных антигенов в ходе культивирования микроорганизма, основным из которых является капсульный полисахарид. Целью нашего исследования явилось нахождение многофакторных регрессионных уравнений, позволяющих описывать влияние начальных концентраций компонентов питательной среды на количество биомассы и капсульного полисахарида (КПС) после культивирования.

В работе применялся метод дробного факторного эксперимента, который был разбит на два этапа: в первом изучалось влияние соевого пептона и глюкозы на конечную концентрацию пневмококка, а во втором – наличие холина и витаминов. В качестве объекта исследования был выбран серотип 23F шт. 96521, поскольку он является частой причиной острого среднего отита у детей и внебольничной пневмонии у взрослых в России и КПС которого, является кандидатным компонентом будущей вакцины. Культивирование проводилось при температуре 37 °С в атмосфере 5% углекислого газа в течение 24 часов. В первом эксперименте в качестве исходных данных выбраны начальные концентрации пептона и глюкозы, варьируемые на двух уровнях: 10 и 30 г/л для пептона, 5 и 20 г/л для глюкозы (таблица 1, варианты 1–4). Во втором проверялось влияние присутствия холина и витаминов в питательной среде на конечную биомассу и КПС (варианты 6–9). В обоих опытах другие компоненты питательной среды (минерально-солевая основа и переменные, варьируемые в другом этапе исследования) оставались неизменными. Также был изучен рост *S. pneumoniae* в случае отсутствия глюкозы. Для этого при вышеуказанных условиях проводилось культивирование при концентрации пептона и глюкозы, равной 20 и 0 г/л соответственно (вариант 5).

Оптическую плотность (ОП) проб определяли на фотоэлектрокалориметре при длине волны 530 нм, исходя из того, что ОП линейно зависит от числа клеток. Количество полисахарида в пробах определялось с помощью ракетного иммуноэлектрофореза.

По полученным данным (таблица 1) были построены модели и оценена адекватность их коэффициентов согласно заданному допустимому уровню значимости ($p = 0,05$ при $\alpha = 0,95$), а также рассмотрено совместное влияние факторов.

Уравнение зависимости количества биомассы от концентрации компонентов среды:

$$Y = 0,7794 + 0,0069 \cdot x_1 + 0,0024 \cdot x_2 + 0,1534 \cdot x_3 + 0,0447 \cdot x_4 + 0,1276 \cdot x_3 \cdot x_4,$$

где x_i – концентрация пептона, глюкозы, холина и витаминов соответственно, Y – десятичный логарифм ОП суточной культуры и после посева $\lg(N/N_0)$). Коэффициент регрессии $R^2 = 0,8912$

Уравнение для КПС:

$$Y = 10,98404 \cdot x - 0,23719 \cdot x^2, \text{ где}$$

x – концентрация пептона, Y – количество полисахарида с учетом, что ОП при посеве должна составлять 0,2. Коэффициент регрессии $R^2 = 0,7305$

Таблица 1. Оптическая плотность и количество КПС, полученные в ходе эксперимента

№ опыта	Концентр. пептона и глюкозы/наличие холина и витаминов, г/л	У _{нач} (ОП в момент посева)	Результаты после культивирования в течение 24 ч				Выходная переменная			
			y _{ii} (ОП)			y ₂ (КПС)	lg(N _i /N ₀)			P·0,2/у _{нач}
			y ₁₁	y ₁₂	y ₁₃	y ₂	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y ₂
1	30/20	0,192	2,056	2,216	1,952	112,5	1,007	1,030	1,062	117,19
	30/5	0,215	1,992	2,064	2,008	125,0	0,967	0,970	0,982	116,28
	10/20	0,180	1,285	1,325	1,4	62,5	0,854	0,867	0,891	69,44
	10/5	0,168	1,237	1,179	1,23	87,5	0,846	0,865	0,867	104,17
	20/0	0,162	0,065	0,074		–	-0.397		-0.32	–
2	+/+	0,168	2,096	2,182	2,078	112,5	1,092	1,096	1,114	133,93
	+/-	0,195	2,020	2,032	2,042	125,0	1,015	1,018	1,020	128,21
	-/+	0,207	2,110	2,050	2,054	125,0	0,996	0,997	1,008	120,77
	-/-	0,210	2,050	2,072	2,062	125,0	0,990	0,992	0,994	119,05

Количество биомассы важно в случае, если разрабатываемая вакцина основана на поверхностных белках пневмококка. Было отмечено, что отсутствие глюкозы в питательной среде существенно ухудшает рост пневмококка. Также существенно влияет холин. Это можно объяснить тем, что он входит в состав фосфолипидов клеточной мембраны. Наименьшей значимостью обладает глюкоза: как показывают экспериментальные данные (вариант 2, таблица), *S. pneumoniae* хорошо растет в среде с пониженным ее содержанием. Это говорит о том, что аминокислоты оказывают больший эффект на рост пневмококка, чем глюкоза. Однако полностью исключать ее из состава питательной среды нельзя, так как в этом случае наблюдается отсутствие роста пневмококка. Поэтому, на основании данных эксперимента, рекомендуется снизить его количество 5 г/л.

Таким образом, полученные модели с помощью метода дробного факторного эксперимента можно применить для предварительной оценки выхода КПС и биомассы *Streptococcus pneumoniae* в зависимости от питательной среды, а также рассчитать ее оптимальный состав.

Соавторы: М.М. Токарская, С.А. Барановская, Д.В. Козловцева

Изменение доли инфекционных вирусных частиц при репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток клещей и млекопитающих

Тучинская Ксения Константиновна

ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Лаборатория биологии арбовирусов

Научные руководители:
д.б.н., профессор Г.Г. Карганова

Флавивирусы, вероятно, существуют как ансамбль различающихся по своей структуре частиц с различной конформацией поверхностных белков. Это инфекционные зрелые вирионы, дефектные вирусные частицы, неинфекционные незрелые вирионы, пустые формы и свободный белок Е. Оценка доли инфекционных частиц к общему числу вирусных частиц является важной характеристикой вирусной популяции, так как присутствие большого количества неинфекционных вирионов может влиять на патогенез и иммунный ответ при вирусной инфекции. Это также важно при оценке эффективности лекарственных и профилактических противовирусных препаратов.

На структурную гетерогенность вирусной популяции могут оказывать влияние различные факторы: система, в которой был размножен вирус, длительность и способ хранения вирусного материала. Целью данной работы было определить соотношение инфекционных и неинфекционных вирусных частиц в процессе флавивирусной инфекции в различных культурах клеток млекопитающих и клещей.

В данной работе мы использовали два варианта одного штамма вируса клещевого энцефалита, один из которых был адаптирован к клещам *Hyalomma marginatum marginatum* (М-вариант), а другой к клеткам млекопитающих (ЭК-328). Для исследования использовались различные культуры клеток клещей и первичные и перевиваемые культуры клеток млекопитающих. Общее число частиц, содержащих геном, было определено ПЦР в реальном времени, количество инфекционных частиц определяли методом бляшек. Количество белка Е в пробах оценивали методом ИФА.

На первом этапе инфекции в культуральной жидкости (КЖ) во всех культурах клеток наблюдалось большое количество неинфекционных вирусных частиц, содержащих геном, что объясняется большой долей вирусных частиц, которые сорбируются на низкоафинных рецепторах, и снижение доли инфекционных вирусных частиц за счет их проникновения в клетки.

Через 20 часов после заражения во всех клетках млекопитающих наблюдалось увеличение доли инфекционных вирионов, которое связано с выходом инфекционных вирусных частиц из клеток. В клетках клещей динамика по соотношению инфекционных и неинфекционных форм вируса в КЖ была сходной, однако пик инфекционности выпадал на 48 часов после заражения. Варианты вируса не отличились между собой по соотношению инфекционных и неинфекционных вирусных частиц при размножении во всех культурах клеток кроме первичных фибробластов мыши.

Ранее было показано, что использование коммерческих наборов ИФА Вектор-Бест не позволяет количественно определить все типы частиц, присутствующие в популяции, однако эффективно определяет частицы, которые могут вызвать инфекцию, что коррелирует с полученными данными по динамике размножения вируса на культурах клеток клещей.

Соавторы: О.А. Белова

Поликетидные антибиотики группы ирумамицина: структура и свойства

Тюрин Антон Павлович

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, Лаборатория химического изучения биологически активных соединений
микробного происхождения

Научные руководители:
д.х.н. В.А. Коршун

Из мицелия штамма *Streptomyces roseoflavus* ИНА-5812 выделено три структурно близких антибиотика: ирумамицин (Рис.1), X-14952В и ранее не описанный AF-C2. Строение веществ установлено на основании масс-спектров высокого разрешения и корреляционных спектров ЯМР.

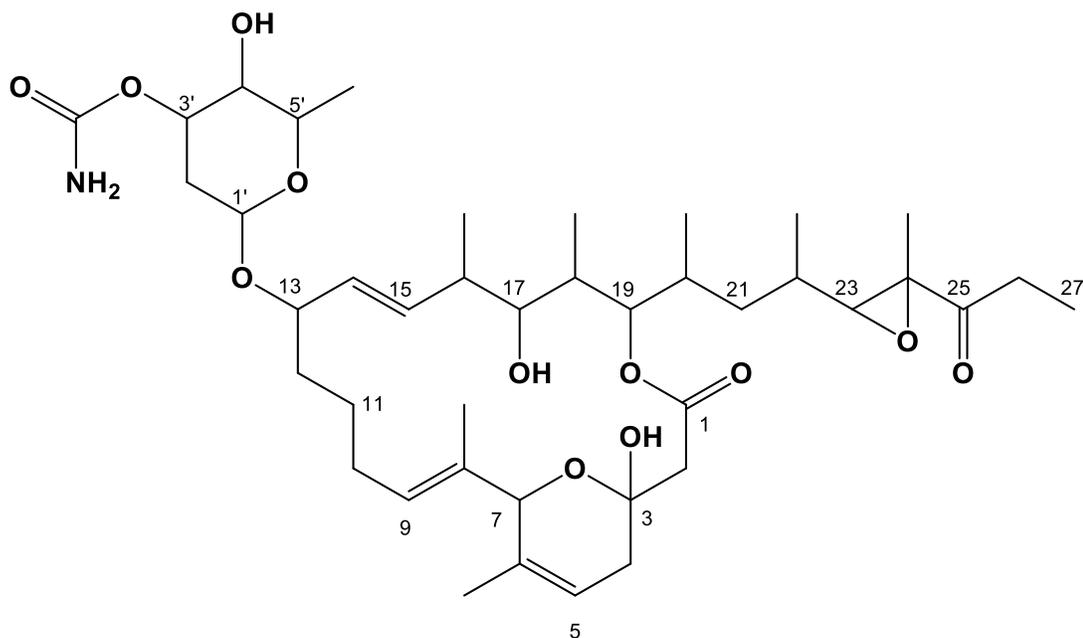


Рис.1. Структура ирумамицина (цифрами указана нумерация атомов углерода).

Данные вещества являются макроциклическими поликетидами, при этом ирумамицин и X-14952В относятся к довольно редкому классу 20-членных макролидов, в то время как AF-C2 – к 18-членным. Антимикробная активность соединений была количественно оценена: показано, что фунгистатические свойства наиболее выражены у ирумамицина.

Все выделенные макролиды проявили цитотоксическую активность на опухолевых клеточных линиях (МТТ-тест). В совокупности с низкой токсичностью это делает ирумамицин и его ближайшие аналоги перспективной и оригинальной платформой для разработки антипролиферативных средств.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-33-00044.

Влияние современных вакцин против гриппа на ключевые эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета

Хромова Екатерина Александровна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний

Научные руководители:
д.м.н., профессор М.П. Костинов
д.м.н. Н.К. Ахматова

Актуальность работы: В настоящее время доказано преимущество адъювантных вакцин по сравнению с безадъювантными вакцинами по формированию специфических антител. Однако, клеточные механизмы, в том числе и параметры врожденного иммунитета, участвующие в поствакцинальном иммунном ответе, изучены недостаточно. Для оценки иммунологической эффективности адъювантных вакцин, наряду с исследованиями гуморальных реакций, необходимым является изучение активации клеточных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета.

Цель: Изучение влияния вакцин против гриппа (иммуноадъювантной и безадъювантных) на иммунофенотип лимфоцитов у женщин детородного возраста и содержание клеток с экспрессией Толл-подобных рецепторов (TLRs) (in vitro).

Материалы и методы: Оценивали субпопуляционную структуру лимфоцитов и экспрессию TLRs лейкоцитов периферической крови у 27 здоровых женщин детородного возраста под воздействием вакцин против гриппа (Инфлювак - субъединичная вакцина, Ваксигрип - сплит-вакцина, Гриппол плюс - полимер-субъединичная иммуноадъювантная вакцина) методом проточной цитометрии на приборе FC-500 (Beckman Coulter, США).

Результаты исследования: В проведенном исследовании действия инактивированных вакцин у людей показано, что и субъединичная вакцина, и сплит-вакцина индуцировали клеточный иммунный ответ, но наибольшим потенциалом обладала иммуноадъювантная вакцина, содержащая Полиоксидоний. Исследуемые вакцины обладали способностью активировать не только эндосомальные рецепторы, но и индуцировали неспецифическую активацию поверхностных TLRs.

Заключение. Изучаемые вакцины против гриппа могут запускать внутриклеточные сигналы, приводящие к индукции противовирусных механизмов иммунного ответа с активацией неспецифических ресурсов организма.

Соавторы: С.А. Сходова, В.Н. Столпникова, Н.К. Ахматова, М.П. Костинов

Взаимозаменяемость функциональных L и 2A последовательностей в контексте генома вируса энцефаломиокардита

Целых Ирина Олеговна

ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Лаборатория биохимии

Научные руководители:

мл.н.с. Ю.Ю. Ивин

к.б.н. А.П. Гмель

Выживаемость вируса зависит от его способности блокировать защитные механизмы клетки. У семейства Picornaviridae эту функцию выполняют «секьюрити»-белки (лидерный (L) и 2A белки). Несмотря на различие структурных и физико-химических свойств этих белков у разных групп внутри семейства, они имеют схожие функции в борьбе с иммунитетом хозяина. Например, белок L у EMCV лишен какой-либо ферментативной активности, а 2A белок Коксакивируса В3 является цистеиновой протеазой, участвующей в процессинге полипротеина, но оба этих белка способны подавлять апоптоз, нарушать ядерно-цитоплазматический транспорт и подавлять синтез интерферонов. В связи с этим встает вопрос о возможной взаимозаменяемости этих белков.

Ранее на основе плазмидной конструкции был получен химерный вирус Менго, в котором часть последовательности лидерного белка L с 7 по 51 аминокислоту заменена на последовательность 2A белка коксакивируса В3. Из-за гетерогенности полученного жизнеспособного потомства было проведено шесть слепых пассажей, после чего отобрано три однородных клонов для дальнейшей работы.

Полногеномное секвенирование отобранных клонов показало, что у клонов #2 и #3 произошла делеция большей части встроенной последовательности (у клона #2 сохранилось 12, а у клона #3 32 С-концевых аминокислоты из 146 исходных). Вероятно, протеазная активность чужеродного 2A белка токсична для вируса. Однако у клона #1 полностью сохранилась встроенная последовательность протеазы, с незначительным изменением - делецией остатка тирозина (Tyr) в положении 90. Поскольку Tyr89 и Tyr90 участвуют в узнавании субстрата, то делеция одного из них могла изменить субстрат специфичность фермента.

Результаты одноциклового эксперимента показали, что клетки HeLa инфицированные клонами #2 и #3 погибают в результате апоптоза, а клетки, инфицированные клоном #1, имеют особый тип клеточной смерти, что говорит о том, что встроенная последовательность способна влиять на тип клеточной смерти, но это требует дополнительного изучения.

По результатам Вестерн-блоттинга белковых лизатов было установлено, что только в клетках, инфицированных клоном #1, происходит расщепление Nip62, что свидетельствует о сохранении протеазной активности встроенного 2A белка. Это в дальнейшем может приводить к нарушению ядерно-цитоплазматического транспорта в клетке.

Суммируя все полученные данные, можно сказать, что адаптация химерного вируса направлена на элиминирование чужеродной протеазной активности. Но при сохранении встроенной последовательности, не свойственная вирусу дикого типа протеазная активность чужеродного 2A белка выполняет (по крайней мере, частично) функции, свойственные лидерному белку L, что говорит о взаимозаменяемости этих белков.

Изучение антагонистической активности аутоштаммов лактобактерий в отношении возбудителя *Clostridium difficile*-ассоциированной инфекции

Чистякова Дарья Алексеевна

ГНЦК им. А.Н. Рыжих, Отдел микробиологических и иммунологических исследований
НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория микробиологических питательных сред

Научный руководитель:
к.б.н. М.А. Сухина

Введение. Антибактериальные препараты нарушают микробиоценоз толстой кишки, провоцируя развитие антибиотикоассоциированной диареи. *Clostridium difficile* является одним из основных этиологических агентов таких инфекций. Рост резистентности *C.difficile* к антибиотикам вызывает необходимость поиска возможностей для борьбы с *Clostridium difficile*-ассоциированной инфекцией. Лактобактерии, являясь аутофлорой кишечной микробиоты, обладают антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микробов за счет продукции бактериоцинов. Бактериоцины- это вещества с узконаправленной или широкой активностью, содержащие в своей структуре полипептиды, низкомолекулярные белки, полисахариды или их комплекс. Поэтому является актуальным поиск штаммов лактобактерий, активно продуцирующих бактериоцины, для создания новых эффективных антибактериальных препаратов.

Целью нашей работы явилось изучение и оценка функциональной активности лактобактерий для ингибирования роста возбудителей антибиотикоассоциированной диареи.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования были использованы штаммы лактобактерий из кишечного биотопа (19). *Lactobacillus plantarum* 38, («лактобактерин сухой» ФГУП «НПО «Микроген» г. Нижний Новгород) применяли в качестве эталонного антагониста, а также штаммы *Clostridium difficile* (31), изолированные от пациентов с *Clostridium difficile*-ассоциированной инфекцией. Для скрининга штаммов, синтезирующих бактериоцины, применяли авторскую методику двухэтапного культивирования микроорганизма-антагониста и тестовой культуры в условиях комбинированной системы (Сухина М.А., 2012). Результат оценивали по зоне задержки роста стафилококка: от 25мм до ≥ 40 мм - высокая; 25мм–15мм – средняя; 5 – 15мм – низкая антагонистическая активность; и ≤ 5 мм антагонизм отсутствует.

Результаты. При исследовании антагонистической активности лактобактерий по отношению к представителям собственной кишечной микрофлоры, были выделены культуры с высокой, средней и отсутствующей антагонистической активностью (рисунок 1). Антагонистически неактивные лактобактерии были не способны подавлять рост *C. difficile*, в отличие от высокоактивных штаммов. Контрольный штамм LP-К в большей степени (71%) демонстрировал высокий уровень антагонистической активности относительно штаммов *C. difficile* (“жертв”).

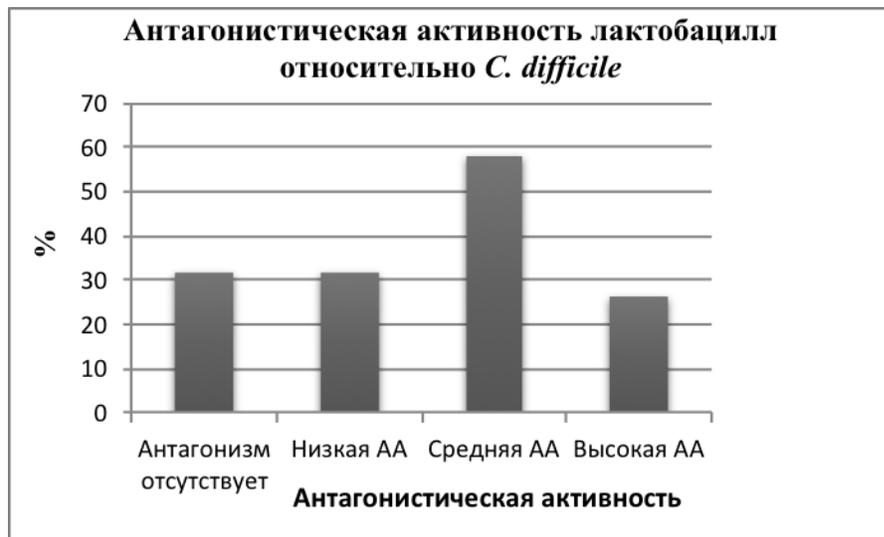


Рисунок 1. Антагонистическая активность лактобацилл относительно *C. difficile*

Способность лактобактерий подавлять рост *C. difficile* была наиболее высокой у пяти штаммов из девятнадцати изученных лактобацилл. Три штамма лактобацилл, подобно контрольному штамму *LP-K* демонстрировали высокий уровень антагонистической активности (71%) в отношении *C. difficile*. Тогда как, штаммы *L. rhamnosus* 400 и *L. paracasei* 245, проявляли наибольшую антагонистическую активность относительно штаммов “жертв”, по сравнению с контрольным штаммом.

Выводы. На основании полученных результатов можно заключить, что с применением авторской методики можно успешно осуществлять поиск новых штаммов лактобацилл обладающих антагонистической активностью в отношении *C. difficile*-возбудителя антибиотикоассоциированной диареи и являющихся кандидатами для создания новых препаратов активных при терапии *C. difficile*-ассоциированной инфекции.

Соавторы: М.А. Сухина

Адьювантные свойства олигохитозанов при добавлении их к живым и инактивированным вакцинам

Шатунова Полина Олеговна

НИИВС им. И.И. Мечникова, Лаборатория генетики РНК-содержащих вирусов

Научный руководитель:
д.м.н. С.Г. Маркушин

Большинство современных инактивированных вирусных вакцин разрабатывается на основе определенных антигенов, которые представляют собой очищенные белки. В некоторых случаях такие вакцины могут обладать низкой иммуногенностью, поэтому для усиления иммунного ответа к ним необходимо добавлять адьюванты (АД). Использование АД позволяет значительно снизить дозы антигенов при иммунизации и увеличить иммуногенность вакцины.

В течение последнего десятилетия большой интерес вызывает новый адьювант – хитозан – продукт дезацетилирования хитина, состоящий из звеньев глюкозамина и N-ацетилглюкозамина. Физико-химические и биологические свойства хитозана могут варьировать в зависимости от молекулярной массы данного вещества, его полидисперсности, степени дезацетилирования, а также распределения остаточных ацетильных групп по полимерной цепи. По молекулярной массе различают высокомолекулярный хитозан (>500 кДа), хитозан со средней молекулярной массой (100-500 кДа), низкомолекулярный хитозан (16-100 кДа) и олигохитозан, являющийся продуктом глубокой деполимеризации хитозана (2-16 кДа). По сравнению с «обычным» хитозаном олигохитозан имеет ряд преимуществ, таких как низкая вязкость и высокая растворимость, повышенная биоцидная активность, возможность использования в медицинских, пищевых и косметических композициях. Для использования хитозана в качестве адьюванта требуются такие оптимальные свойства, как хорошая растворимость в физиологических средах, низкая гемостатическая активность, высокие титры иммуногенности вакцинных препаратов. Однако высокополимерный хитозан обладает высокой гемостатической активностью, что делает его непригодным в качестве адьюванта для инактивированных вирусных вакцин, вводимых парентерально. В данной работе мы попытались изучить возможность использовать олигохитозаны в качестве адьювантов для инактивированных и живых вирусных вакцин, учитывая их низкую гемостатическую активность.

Использование высокомолекулярного хитозана приводит к склеиванию эритроцитов и тромбозу сосудов в месте введения вакцины, что абсолютно недопустимо при иммунизации лиц с повышенной свертываемостью крови. Механизм гемостатического действия хитозана заключается в способности его положительно заряженных молекул взаимодействовать с отрицательно заряженными белками на поверхности эритроцитов, вызывая их агглютинацию. Нами было экспериментально доказано, что уровень гемостатической активности хитозана зависит от его молекулярной массы. Таким образом, гемостатическая активность олигохитозана с $M_w < 16$ кДа ниже на 1.5-2 порядка относительно хитозана с $M_w > 16$ кДа. В ходе дальнейших экспериментов было обнаружено, что олигохитозан, взятый в качестве АД, не уступает по уровню повышения иммуногенности вакцины высокомолекулярному хитозану. Как показывают исследования, иммуностимулирующая активность данного соединения также тесно связана с величиной СА. Так иммуномодулирующая активность олигохитозана с $M_w = 7 \pm 1$ кДа является максимальной при степени N-ацетилирования 6 ± 1 мол.%, тогда как снижение содержания ацетильных групп до 1 мол.% или повышение до 18 мол.% и выше многократно понижает иммуномодулирующую активность. Все образцы с $M_w < 5$ кДа проявляют

низкую АД эффективность независимо от величины СА. Возможно, что степень связывания иммуногенов с олигохитозаном в нерастворимый комплекс (так называемое «депо») и пролонгированность его действия может зависеть не только от содержания ацетильных групп, но и от их распределения по полимерной цепи данного вещества. Изучение *in vitro* цитотоксичности производных хитозана на ЛЭК показало, что все олигохитозаны и хитозаны с Mw <50 кДа являются практически нецитотоксичными.

Олигохитозаны и хитозаны с Mw <50 кДа, обладающие низкими значениями цитотоксичности и гемагглютинирующей способности, а так же высокими показателями иммуностимулирующей и антибактериальной активности, могут быть использованы в качестве АД для инактивированных гриппозных и полиомиелитных вакцин при парентеральном введении и для живых гриппозных вакцин при мукозальном введении.

Соавторы: И.И. Аكوпова, С.Г. Маркушин, В.Е. Тихонов