

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ PSEUDOMONAS AERUGINOSA: ВЛИЯНИЕ НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ У МЫШЕЙ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова

Цель. Исследование влияния рекомбинантных антигенов *P. aeruginosa* на ключевые эффекторы иммунной системы. *Материалы и методы.* Мышам внутрибрюшинно вводили по 25 мкг OprF и 50 мкг анатоксина, сорбированных на геле гидроксида алюминия, с интервалом в 2 недели. Через 7 дней после последней иммунизации у животных оценивали субпопуляционную структуру лимфоцитов селезенки методом проточной цитометрии. Уровень цитокинов в сыворотках мышей после однократной иммунизации рекомбинантными антигенами OprF и анатоксином исследовали через 4, 8, 24 час и 14 суток методом проточной цитометрии при помощи тест-системы FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex. *Результаты.* Рекомбинантные антигены OprF и анатоксина оказывали влияние на молекулярно-клеточные механизмы иммунного ответа, приводящие к изменению уровня экспрессии дифференцировочных и активационных молекул, а также синтеза Th1/Th2/Th17/Th21/Th22 цитокинов у мышей, необходимых для эффективной презентации антигена. *Заключение.* Комплекс рекомбинантных OprF и анатоксина способствовал формированию полноценного иммунного ответа против синегнойной палочки.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 52—58

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белок F наружной мембраны (OprF), анатоксин, рекомбинантный белок, иммунофенотип, цитокины

N.A. Mikhaylova, E.O. Kalinichenko, A.V. Soldatenkova, N.K. Akhmatova

RECOMBINANT ANTIGENS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA: EFFECT ON IMMUNE RESPONSE IN MICE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russia

Aim. Study the effect of recombinant antigens of *P. aeruginosa* on key effectors of the immune system. *Materials and methods.* Mice were immunized intraperitoneally with 25 µg of OprF and 50 µg of anatoxin sorbed on aluminium hydroxide gel with a 2 week interval. 7 days after the last immunization spleen lymphocyte subpopulation structure was evaluated by flow cytometry. Cytokine levels in mice sera were studied after a single immunization with recombinant OprF and anatoxin at 4, 8, 24 hours and 14 days by flow cytometry using FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex. *Results.* OprF recombinant antigens and anatoxin affect molecular-cell mechanisms of immune response resulting in alteration of expression of differentiating and activating molecules as well as synthesis of Th1/Th2/Th17/Th21/Th22 cytokines in mice that are necessary for effective presentation of the antigen. *Conclusion.* Complex of recombinant OprF and anatoxin facilitated formation of complete immune response against pseudomonas.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 52—58

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane protein F, anatoxin, recombinant protein, immune phenotype, cytokines

ВВЕДЕНИЕ

Бактерия *Pseudomonas aeruginosa* — грамотрицательная палочка, относящаяся к семейству Pseudomonadaceae, условный патоген, способный вызывать заболевания у людей, животных и растений. Она имеет важное медицинское

значение вследствие своей убиквитарности, широкой антибиотикорезистентности, а клиническое течение патологии, вызванной данным возбудителем, характеризуется полиорганностью поражения (кожа, подкожная клетчатка, мочевыводящие пути, ЖКТ, ЦНС и др.) [4].

Инфекции, вызванные синегнойной палочкой, зачастую встречаются у иммунокомпрометированных лиц либо осложняют течение предсуществующей острой (ожоговая болезнь) или хронической (муковисцидоз) болезни [7, 10].

В настоящее время проводятся исследования различных факторов вирулентности *P. aeruginosa*, изучаются новые пути введения вакцин (пероральный, назальный), разрабатываются модели рекомбинантных вакцин нового поколения [6]. Но результаты клинических испытаний вакцин против синегнойной инфекции, проводимых во всем мире, не подтверждают их высокую эффективность, которая могла бы обеспечить защиту от *P. aeruginosa* [11].

Причины неудач остаются не вполне ясными. Один из факторов, мешающих организму выработать эффективный иммунный ответ на вакцинацию — способность синегнойной палочки изменять фенотип при росте в организме. Так, положить начало колонизации дыхательных путей может бактерия немуюкоидного фенотипа с низкой продукцией альгината, а затем изменить фенотип в сторону его гиперпродукции с образованием биопленки, но скудным синтезом цепей О-антигена [12].

Белки наружной мембраны — одни из наиболее многообещающих в качестве компонентов кандидатных вакцин благодаря возможности получения их генно-инженерным методом и генетической либо химической модификацией [11]. Современная технология белков располагает методами конъюгирования между собой и с веществами отличной химической природы, например, полисахаридами. Методы генной инженерии позволяют синтезировать в клетках определенные антигены с заранее заданными свойствами, и в настоящее время с применением этих методов разрабатываются вакцины против *P. aeruginosa* и исследуются иммуногенные свойства кандидатных препаратов [2, 5, 6, 9].

Ранее получены и исследованы рекомбинантный белок наружной мембраны (OprF) [1] и рекомбинантная делеционная атоксическая форма экзотоксина А (анатоксин) [3], которые обладали протективной активностью, защищая животных от живой вирулентной культуры *P. aeruginosa*. При этом подобрана оптимальная схема введения препаратов и оптимальные иммунизирующие дозы, а также показано, что использование обоих рекомбинантных белков в комплексе приводило к аддитивному эффекту [2].

В настоящее время индукция иммунного ответа под воздействием *P. aeruginosa*, а также клеточные и молекулярные события, вызванные антигенными компонентами этого патогена, остаются мало охарактеризованными. Поэтому целью нашего исследования явилось изучение влияния рекомбинантных антигенов *P. aeruginosa* на ключевые эффекторы иммунной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве препарата исследования использовали комплекс очищенных рекомбинантных белков (рекомбинантный белок наружной мембраны и рекомбинантный анатоксин), получение и очистка которых описана в предыдущих исследованиях [2]. Для иммунизации препарат рекомбинантных белков смешивали в равных весовых долях с гелем гидроксида алюминия (НПО «Микроген»), разводили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и проводили

сорбцию в течение 12 часов при температуре 4°C. Вакцинный препарат вводили мышам-самкам линии BALB/c весом 14 — 16 г внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл.

Суспензию мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) получали, гомогенизируя селезенку в 5 мл среды RPMI 1640 (ПанЭко, Россия). Клетки осаждали центрифугированием с ускорением 250 g при температуре 4°C в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали и удаляли эритроциты гипотоническим шоком: к осадку добавляли 900 мкл дистиллированной воды и перемешивали 10 сек, затем добавляли 100 мкл 10-кратного раствора Хэнкса (МПБП, Россия). После лизиса эритроцитов спленоциты осаждали и дважды отмывали средой RPMI-1640. Подсчет живых и мертвых клеток проводили в камере Горяева, используя 0,1% раствор трипанового синего в 0,9% растворе NaCl.

Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки мышей осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител против соответствующих антигенов различных субпопуляций лимфоцитов. Через 7 дней после последней иммунизации у животных забирали селезенки в соответствии с «Правилами проведения работ с экспериментальными животными» для последующего получения лимфоцитов. Клетки отмывали холодным ФСБ с 1% фетальной телячьей сывороткой (ФТС) и окрашивали согласно инструкции производителя (Caltag Laboratories, США) мечеными флюорохромом моноклональными антителами к поверхностным клеточным маркерам (CD3, CD4, CD8, CD19, МНС II, меченные FITC; CD25, NK1.1 (CD16/CD32) — PE). Затем клетки отмывали 2 раза холодным ФСБ с 1% ФТС. Результаты учитывали на проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США). Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 5000 клеток в гейте. Статистическую обработку материала проводили при помощи программного пакета WinMDI 2.8.

Уровень цитокинов в сыворотках и супернатантах селезенки мышей определяли на проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США) при помощи тест-системы FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex с использованием шариков, сенсibilизированных моноклональными антителами к цитокинам (GM-CSF, INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α), eBioscience (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Комплекс рекомбинантных OrgF и анатоксина в дозах 25 мкг и 50 мкг вводили самкам мышей BALB/c. Через 4 часа, 8 часов, 24 часа и 14 дней после иммунизации по десять мышей использовали для тотального забора крови с целью получения групповых пулов сыворотки крови. В качестве контрольной сыворотки использовали пул сывороток крови, отобранной у десяти мышей до иммунизации.

Уровень TNF- α в сыворотке крови мышей до введения рекомбинантных белков (0 ч) составлял 4,53 пг/мл. Введение препарата способствовало постепенному повышению уровня TNF- α , который достигал максимальных значений к 24 ч (38,5 пг/мл, $p < 0,05$). К концу второй недели после иммунизации данный показатель снижался до 7,5 пкг/мл. IL-1 β у мышей до введения белков составил 2,43 пг/мл, после введения препарата уровень его активно возрастал и к 8 часам достигал максимального значения (32,47 пкг/мл). Далее происходило его постепенное снижение до 10,4 пкг/мл к 24 часам и до 4,82 пкг/мл — на 14 сутки наблюдения. Аналогичная картина наблюдалась в отношении

IL-1 α : максимальный уровень выявлен на 8 ч исследования, который постепенно понижался к 24 часам (6,7 пкг/мл) и 14 суткам (7,84 пкг/мл). Уровень IFN- γ повышался только на 24 ч после введения препарата (с 1,4 до 15,23 пкг/мл, $p < 0,05$) и снижался до 5,9 пкг/мл через 14 суток. Содержание IL-12p70 значимо возрастало к 8 часам наблюдения (23,13 пкг/мл) и достигло максимальных значений через 24 часа (34,23 пкг/мл).

Изначально концентрация IL-2, обеспечивающего пролиферацию и дифференцировку Th1 клеток, соответствовала 2,8 пкг/мл. Использование комплекса приводило к некоторому повышению этого показателя у мышей уже через 4 часа, и он оставался на уровне нормальных значений весь период наблюдения. Уровень IL-4 незначительно повышался (с 4,99 до 7,1 пкг/мл) через 8 часов после введения препарата и достигал нормальных значений к 24 часам. Уровень IL-5 через 4 часа после иммунизации повышался приблизительно в 3 раза по сравнению с интактными мышами ($4,26 \pm 1,2$), в то время как уровень IL-10 нарастал только к концу 1 суток после введения препарата (в 4 раза) — с 5,7 до 21,13 пкг/мл. Положительная динамика на срок 8 и 24 часов отмечалась в отношении IL-6 (повышение с 3,42 до 7,46 и 18,43 пкг/мл соответственно). Только со стороны IL-6 (повышение с 3,42 до 7,46 и 18,43 пкг/мл соответственно). Только со стороны IL-6 (повышение с 3,42 до 7,46 и 18,43 пкг/мл соответственно). Только со стороны IL-6 (повышение с 3,42 до 7,46 и 18,43 пкг/мл соответственно). Только со стороны IL-6 (повышение с 3,42 до 7,46 и 18,43 пкг/мл соответственно).

Далее были изучены показатели Th17/Th21/Th22 цитокинов в сыворотках мышей под воздействием комплекса рекомбинантных белков. Значительное усиление продукции IL-17 происходило уже в первые часы после введения препарата, и его пик приходился на 8 часов (4801 пкг/мл). Через сутки происходило снижение уровня данного цитокина, но он все равно был выше исходных значений в 7,56 раза (146,3 пкг/мл против 19,33 пкг/мл). К 14 суткам данный показатель возвращался к исходному уровню (19,33 пкг/мл). Концентрация IL-21 также нарастала постепенно, начиная с 4 часов (с 0 пкг/мл до 3,66 — 11,77 пкг/мл), максимальные значения IL-21 (17,33 пкг/мл) отмечались через 8 часов после введения препарата. В отношении IL-22 выявлено значимое повышение концентрации только через 8 часов после иммунизации животных (15,03 пкг/мл). На 14 сутки уровень IL-21 и IL-22 соответствовали фоновым значениям.

Таким образом, в отношении IL-1 β , IL-1 α и TNF- α отмечалось повышение уровня на все сроки наблюдения с постепенным снижением к концу суток (кроме TNF- α). Концентрация IL-2 также возрастала в те же сроки, но не столь существенно. IFN- γ повышался только через 24 часа после иммунизации, а IL-12p70 — через 8 и 24 часа. Таким образом, комплекс рекомбинантных белков индуцировал синтез Th1 цитокинов у мышей. В отношении Th2 цитокинов наблюдали статистически значимый ответ со стороны IL-4, IL-5 и IL-10 (соответственно через 8,4 и 24 часа). Продукция IL-6 была более результативной на 8 и 24 часа определения. Исследование динамики Th17/Th21/Th22 цитокинов выявило повышение уровня IL-17A и IL-21 на все сроки наблюдения, а IL-22 — только через 8 часов (повышение в 3,2 раза).

Комплекс рекомбинантных OpgF и анатоксина у мышей BALB/c статистически значимо повышал уровень Th1/Th2/Th17/Th21/Th22 цитокинов в сыворотках крови в разные сроки после введения: через 4 часа IL-1 α , IL-5 (соответственно в 5,14; 1,9 раза); через 8 часов — IL-1 β , IL-2, IL-4 (соответственно в 13; 2,7; 1,4 раза), а также Th17/Th21/Th22 цитокинов — IL-17A и IL-22 (соответственно в 248 и 3,24 раза) и IL-21 (с неопределяемого значения до $17,13 \pm 1,59$ пкг/мл); через 24 часа — IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α и IFN- γ (соответственно, в 8,5; 10,8; 5,3; 3,7; 5,4 раза) по сравнению с исходным уровнем.

Таблица 1. Экспрессия цитокинов в культуре спленоцитов мышей BALB/c под воздействием комплекса рекомбинантных белков

Цитокин		Мыши			
Тип	Класс	Интактные	Интактные + ФГА	Иммунизированные	Иммунизированные + ФГА
Th1	IL-1 β	5,7 \pm 0,36	39,37 \pm 2,96	5,1 \pm 0,91	21,2 \pm 2,1*
	IL-1 α	5,3 \pm 0,75	58,65 \pm 1,94	4,23 \pm 0,51	10,6 \pm 2,19*
	IL-2	9,3 \pm 1,41	17,33 \pm 2,05	5,6 \pm 0,91	21,37 \pm 2,87
	TNF- α	3,3 \pm 0,65	11,8 \pm 7,43	3,23 \pm 0,8	16,2 \pm 2,1
	IFN- γ	31,97 \pm 3,32	107,9 \pm 13,47	48,57 \pm 6,23	164,7 \pm 7,37*
	IL-12p70	6,76 \pm 0,45	18,2 \pm 2	18,27 \pm 2,1	45,17 \pm 5*
Th2	IL-4	6,43 \pm 0,22	24,07 \pm 2,9	4,26 \pm 1,05	25,3 \pm 2,74
	IL-5	3,36 \pm 0,8	12,87 \pm 2,27	4,4 \pm 0,01	43,43 \pm 58,78*
	IL-6	4,66 \pm 0,85	21,37 \pm 2,75	3,76 \pm 0,35	15,4 \pm 2,95
	IL-10	12,43 \pm 2,27	45,77 \pm 3,65	28,33 \pm 2,96	67,73 \pm 5,98*
	IL-13	8,51 \pm 1	514,9 \pm 53,03	9,2 \pm 1,01	112,41 \pm 14,01*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. * достоверность различий по сравнению со стимулированными спленоцитами неиммунизированных мышей, $P < 0,05$ (Тест Манна-Уитни).

Исходя из вышеприведенных данных, можно сделать заключение, что препарат активирует как клеточное, так и гуморальное звено иммунной системы. Учитывая, что в сыворотках на 14 сутки уровень практически всех цитокинов соответствовал референсным значениям, интерес представляло определение стимулированной активности лимфоцитов селезенки иммунизированных мышей. В качестве контроля использовали селезенки интактных мышей.

Данные табл. 1 показывают, что фитогемагглютинин (ФГА) в культуре интактных спленоцитов активнее индуцировал синтез IL-1 β , IL-1 α (соответственно в 1,86 и 5,53 раза), а в культуре клеток иммунизированных мышей — регуляторных цитокинов IFN- γ и IL-12p70 (соответственно в 1,52 и 2,5 раза). По экспрессии IL-2 и TNF- α эти группы значимо между собой не отличались. В отношении Th2 цитокинов спленоциты иммунизированных мышей при стимуляции их ФГА продуцировали большее количество IL-5 и IL-10 (в 3,4 и 1,5 раза) и значительно меньшее — IL-13 (в 4,6 раза) по сравнению с неиммунизированными.

Что касается Th17/Th21/Th22 цитокинов, то уровень IL-17A и IL-21 у иммунизированных мышей при стимуляции клеток ФГА статистически значимо не отличался от стимулированной культуры неиммунизированных животных, в отличие от IL-22, где активность спленоцитов у иммунизированных животных превышала значения у интактных в 1,64 раза (табл. 2).

Изучение субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки мышей

Таблица 2. Экспрессия Th17/Th21/Th22 цитокинов в культуре спленоцитов мышей BALB/c под воздействием комплекса рекомбинантных белков

Мыши	IL-17A	IL-21	IL-22
Интактные	154 \pm 7,93	0	11,63 \pm 1,59
Интактные+ ФГА	2444 \pm 82,98	34,6 \pm 4,38	27,87 \pm 2,8
Иммунизир.	38,19 \pm 3,93	17,67 \pm 17,3	25,9 \pm 2,55
Иммунизир. + ФГА	2450 \pm 71,51	39,07 \pm 3,1	45,83 \pm 3,75*

(табл. 3) показало, что в опытной группе (иммунизированные мыши) повышалось содержание NK-клеток (CD16+/CD32+, в 1,64 раза), Т-хелперов (CD4+, в 1,25 раза), В1-лимфоцитов (CD5+, в 1,13 раза), В2-лимфоцитов (CD19+, в 2,3 раза) при снижении численности цитотоксических лимфоцитов (CD8+, в

1,47 раза) по сравнению с контролем (неиммунизированные мыши). В общей популяции клеток повышалось содержание типов, экспрессирующих маркеры ранней (CD25+) и поздней (MHCII+) активации клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение экспрессии цитокинов при внутрибрюшинном введении мышам комплекса рекомбинантных OpgF и анатоксина позволяет сделать вывод о различной направленности иммунных процессов. Так, данный комплекс у мышей BALB/c в сыворотках крови статистически значимо повышал уровень Th1/Th2/Th17/Th21/Th22 цитокинов в разные сроки после введения: через 4 часа IL-1 α , IL-5; через 8 часов — IL-1 β , IL-2, IL-4, а также Th17/Th21/Th22 цитокинов — IL-17, IL-21; через 24 часа — IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α и IFN- γ по сравнению с исходным уровнем. К концу второй недели эти показатели возвращались к исходным значениям, что может свидетельствовать о закономерной нормализации цитокинового профиля мышей.

В культуре спленоцитов у иммунизированных мышей отмечено повышение индуцированной ФГА продукции регуляторных Th1 цитокинов IFN- γ и IL-12p70; Th2 цитокинов — IL-5 и IL-10; снижение уровня IL-13. В отношении Th22 цитокинов — выявлено повышение в 1,64 раза концентрации IL-22 в супернатантах селезенок мышей по сравнению с неиммунизированными животными.

У иммунизированных мышей по сравнению с интактными повышалась численность активированных NK-клеток, Т-хелперов, В1, В2-лимфоцитов при выявленном снижении численности цитотоксических Т-лимфоцитов.

Повышение содержания провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 в сыворотке иммунизированных животных должно стимулировать выработку INF- γ NK-клетками и Т-лимфоцитами. Согласно современным представлениям, INF- γ индуцирует дифференцировку CD4 + клеток в Th1-хелперы, обладающие способностью к продукции INF- γ , IL-2 и лимфотоксина- α . INF- α способен ингибировать дифференцировку CD4+ клеток в Th2 тип, синтезирующий IL-4, IL-5, и IL-10, которые являются мощными ингибиторами цитокинов Th1 типа.

В данном исследовании введение мышам комплекса рекомбинантных OpgF и анатоксина приводило к повышению уровня Th9/Th17/Th22 цитокинов. Известно, что IL-17A продуцируется уникальной субпопуляцией Т-хелперных клеток независимо от Th1/Th2 клеточного развития. Th17 клетки играют роль в защите организма от внеклеточных патогенов посредством рекрутирования нейтрофилов и макрофагов в инфицированные ткани [8].

Выявленное в данной работе повышение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов свидетельствует о закономерности происходящих событий, поскольку продукция противовоспалительных цитокинов может оказывать сдерживающее действие на чрезмерный синтез провоспалительных цитокинов, способный оказывать повреждающий эффект на ткани и функции органов.

На тканевом уровне Th цитокины ответственны за развитие воспаления с

Таблица 3. Иммунофенотип лимфоцитов селезенок мышей BALB/c под воздействием комплекса рекомбинантных белков

Лимфоциты	Опыт	Контроль
CD3+	58,57 \pm 0,7	61,37 \pm 1,09
CD16+/CD32+	13,28 \pm 1,81*	8,06 \pm 0,68
CD3+/CD16/CD32	5,46 \pm 0,40	3,06 \pm 0,25
CD4 +	45,17 \pm 1,05*	36,04 \pm 0,88
CD25+	29,4 \pm 1,93*	5,33 \pm 0,85
CD5+	51,5 \pm 0,8*	45,3 \pm 0,96
CD19+	28,17 \pm 1,33*	12,17 \pm 1
CD8a+	14,7 \pm 1,03*	21,63 \pm 1,66
MHCII+	25,43 \pm 1,06*	14,3 \pm 0,91

последующей регенерацией тканей. При развитии системной воспалительной реакции цитокины влияют практически на все органы и системы организма, участвующие в регуляции гомеостаза.

Исследования выявили, что комплекс рекомбинантных ОпрF и анатоксина может способствовать формированию клеточного звена иммунного ответа, обеспечивая полноценный противомикробный иммунитет.

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать следующее заключение: комплекс рекомбинантных ОпрF и анатоксина *P. aeruginosa* оказывает влияние на молекулярно-клеточные механизмы иммунного ответа, приводящее к изменению уровня экспрессии дифференцировочных молекул и молекул активации, а также синтеза цитокинов у мышей. Действие комплекса рекомбинантных ОпрF и анатоксина связано с регулирующим действием на иммунные механизмы, активацией эффекторов иммунной системы для эффективной презентации антигена и формирования полноценного иммунного ответа. Поэтому комплекс рекомбинантных ОпрF и анатоксина может рассматриваться в качестве кандидата в разработке вакцины против синегнойной палочки.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2016 год.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калошин А.А., Гатыпова Е.В., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств. Биотехнология. 2011, 2: 74-84.
2. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств комплекса рекомбинантного белка F наружной мембраны и рекомбинантного анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2016, 71 (1): 117-122.
3. Калошин А.А., Исаков М.А., Михайлова Н.А., Вертиев Ю.В. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 9: 330-335.
4. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015, 17 (3): 170-186.
5. Baumann U., Mansouri E., von Specht B.U. Recombinant OprF-OprI as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections. Vaccine. 2004, 22 (7): 840-847.
6. Döring G., Pier G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine. 2008, 26(8): 1011-1024.
7. Edwards-Jones V., Greenwood J.E. What's new in burn microbiology? James Laing Memorial Prize Essay 2000. Burns. 2003, 29: 15-24.
8. Hasan M., Neumann B., Hauptlshofer S. et al. Activation of TGF- β -induced non-Smad signaling pathways during Th17 differentiation. Immunology Cell. Biology. 2015, 3: 216-223.
9. Hertle R., Mrsny R., Fitzgerald D.J. Dual-function vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of chimeric exotoxin A-pilin protein. Barbieri J.T. (ed.). Infection Immunity. 2001, 69 (11): 6962-6969.
10. Lund-Palau H., Turnbull A.R., Bush A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. Expert Rev. Respiratory Medicine. 2016, 10 (6): 685-697.
11. Pier G.B., Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. New York, 2010.
12. Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M. et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. J. Clinical Investigation. 2002, 109 (3): 317-325.

Поступила 03.02.17

Контактная информация: Михайлова Наталья Александровна, д.м.н., проф., 105064, Москва, М.Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-56-30