

*Н.А.Михайлова, Е.О.Калиниченко, А.В.Солдатенкова, Н.К.Ахматова*

## **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, сенсibiliзировавшихся моноклональными антителами к цитокинам (GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ ), 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- $\alpha$  в сыворотке крови мышей до введения рекомбинантных белков (0 ч) составлял 4,53 пг/мл. Введение препарата способствовало постепенному повышению уровня TNF- $\alpha$ , 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 $\beta$  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 $\alpha$ : 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- $\gamma$  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 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  и TNF- $\alpha$  отмечалось повышение уровня на все сроки наблюдения с постепенным снижением к концу суток (кроме TNF- $\alpha$ ). Концентрация IL-2 также возрастала в те же сроки, но не столь существенно. IFN- $\gamma$  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 $\alpha$ , IL-5 (соответственно в 5,14; 1,9 раза); через 8 часов — IL-1 $\beta$ , 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- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  (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 $\beta$	5,7 $\pm$ 0,36	39,37 $\pm$ 2,96	5,1 $\pm$ 0,91	21,2 $\pm$ 2,1*
	IL-1 $\alpha$	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- $\alpha$	3,3 $\pm$ 0,65	11,8 $\pm$ 7,43	3,23 $\pm$ 0,8	16,2 $\pm$ 2,1
	IFN- $\gamma$	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 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  (соответственно в 1,86 и 5,53 раза), а в культуре клеток иммунизированных мышей — регуляторных цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-12p70 (соответственно в 1,52 и 2,5 раза). По экспрессии IL-2 и TNF- $\alpha$  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 $\alpha$ , IL-5; через 8 часов — IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, а также Th17/Th21/Th22 цитокинов — IL-17, IL-21; через 24 часа — IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  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 $\beta$  и IL-6 в сыворотке иммунизированных животных должно стимулировать выработку INF- $\gamma$  NK-клетками и Т-лимфоцитами. Согласно современным представлениям, INF- $\gamma$  индуцирует дифференцировку CD4 + клеток в Th1-хелперы, обладающие способностью к продукции INF- $\gamma$ , IL-2 и лимфотоксина- $\alpha$ . INF- $\alpha$  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 разработку 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 атотоксической 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., Hauptshofer S. et al. Activation of TGF- $\beta$ -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