

4. Chao C.C., Ma Y.S., Stadtman E.R. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997, 94: 2969-2974.
5. Dover S.E., Aroutcheva A.A., Faro S., Chikindas M.L. Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. International J. Probiotics & Prebiotics. 2008, 3 (4): 219-230.
6. Ivanov R.A., Soboleva O.A., Smirnov S.A. et al. Effect of surfactants of different types on the bacteriolytic activity of lysozyme. Rus. J. Bioorg. Chem. 2015, 41 (3): 260-265.
7. Kaewsrichan J., Peeyananjarassri K., Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006, 48 (1): 75-83.
8. Nakata K., Tsuchido T., Matsumura Y. Antimicrobial cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide, induces superoxide stress in Escherichia coli cells. J. Applied Microbiology. 2011, 110 (2): 568-579.
9. Nash J.A., Ballard T.N., Weaver T.E., Akinbi H.T. The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity in vivo. J. Immunol. 2006, 177 (1): 519-526.
10. Sgibnev A.V., Kremleva E.A. Vaginal protection by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli. Jundishapur J. Microbiology. 2015, 8 (10): A e22913.
11. Simonian M. H., Smith J. A. Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. Curr. Protoc. Mol. Biol. 2006, 76. 10.1A:10.1.1-10.1A.9.
12. Valore E.V., Park C.H., Igrati S.L., Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. Am. J. Obstet. Gynecol. 2002, 187 (3): 561-568.
13. Willumsen P.A., Karlson U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegradation. 1997, 7 (5): 415-423.
14. Wilson M. Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease. Cambridge University Press. 2005.
15. Yarbrough V.L., Winkle S., Herbst-Kralovetz M.M. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: A critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. Human Reproduction Update. 2015, 21 (3): 353-377.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.В.Шевченко, О.А.Медведева, А.Ю.Мухина, В.А.Королев, П.В.Калуцкий*

## **СОСТАВ НОРМОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС ПЛАЗМЫ КРОВИ, КОЛОНОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИСБИОЗЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА РИОФЛОРА ИММУНО НЕО**

Курский государственный медицинский университет

*Цель.* Изучение изменений состава микробиоценоза толстого кишечника животных и молекулярно-биохимических показателей плазмы крови и колоноцитов в условиях экспериментального лекарственного дисбиоза, возможности их коррекции с использованием пробиотика. *Материалы и методы.* Животным формировали лекарственный дисбиоз внутрибрюшинным введением гентамицина, после с целью коррекции вводили пробиотик. Количественное и качественное исследование мукозной микрофлоры толстой кишки мышей проводили бактериологическим методом. О состоянии системы перекисного окисления липидов судили по содержанию ацилгидроперекисей и малонового диальдегида, системы антиоксидантной защиты — по активности ферментов (каталаза и супероксиддисмутазы). *Результаты.* В результате проведенного исследования зарегистрировано изменение состава кишечной микрофлоры, снижение ферментативной активности системы антиоксидантной защиты в плазме крови и колоноцитах, увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и колоноцитах. Отмечен корригирующий эффект пробиотика РиоФлора Иммуно Нео в отношении восстановления нормобиоценоза кишечника и молекулярно-биохимических показателей колоноцитов животных. *Заключение.* Использование пробиотика привело к восстановлению микробного равновесия в микробиоценозе кишечника, а также оказало

положительное влияние на активность супероксиддисмутазы колоноцитов, стабилизацию содержания малонового диальдегида в ткани толстого кишечника.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 27—33

Ключевые слова: мукозная микрофлора толстого кишечника, дисбиоз, антиоксидантная система, РиоФлора Иммуно Нео

*A.V.Shevchenko, O.A.Medvedeva, A.Yu.Mukhina, V.A.Korolev, P.V.Kalutsky*

## **LARGE INTESTINE NORMOBIOCENOSIS AND PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE OF COLONOCYTES, BLOOD PLASMA IN EXPERIMENTAL DISBIOOSIS AND USAGE OF RIOFLORA IMMUNO NEO PROBIOTIC**

Kursk State Medical University, Russia

*Aim.* Study the changes in the composition of animals large intestine microbiocenosis and molecular-biochemical parameters of blood plasma and colonocytes in experimental gentamicin dysbiosis, possibility of correction using probiotic. *Materials and methods.* Drug dysbiosis was simulated by administration of gentamicin intraperitoneally and with correction aim injected probiotic. Quantitative and qualitative study of mucous microflora of the mice large intestine was performed by bacteriological method. The state of lipid peroxidation system was judged about by content of acylhydroperoxide and malonic dialdehyde, antioxidant protection system — by catalase and superoxide dismutase. *Results.* As a result of the study, a change in the composition of the intestinal microflora, a decrease in the enzymatic activity of antioxidant defense system in blood plasma and colonocytes, an increase in the content of lipid peroxidation products in blood plasma and colonocytes were recorded. The corrective effect of RioFlora Immuno Neo probiotic regarding the restoration of the intestine normobiocenosis and the molecular-biochemical parameters of animal colonocytes was noted. *Conclusion.* The use of the probiotic led to the restoration of microbial equilibrium in the intestinal microbiocenosis, and also had a positive effect on the superoxide dismutase activity of colonocytes, stabilization of the malonic dialdehyde content in the colon tissue.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 27—33

Key words: large intestine mucous microflora, dysbiosis, antioxidant system, RioFlora Immuno Neo

## **ВВЕДЕНИЕ**

Нормальная микрофлора организма человека — это открытый биоценоз микроорганизмов, встречающийся у здоровых людей. Микробные популяции различных биотопов в норме выступают в роли симбионтов или сапрофитов, находясь в экологическом равновесии с организмом хозяина. Их взаимное влияние определяется механическими, биохимическими, микробиологическими, иммунологическими факторами [9].

Различные воздействия на макроорганизм экзогенных и эндогенных факторов могут приводить к количественным и/или качественным изменениям микробиоценоза толстого кишечника. Нарушение микроэкологии пищеварительного тракта, чаще обозначаемого в отечественной литературе как дисбиоз, представляет собой состояние микробиоты, при котором происходят нарушения функционирования ее составных частей и механизмов их взаимодействия [5].

Причинами изменений качественного и количественного состава кишечной микрофлоры являются воздействие на организм различных факторов экзогенного и эндогенного характера (возраста, образа жизни, сезона го-

да, характера питания, в том числе и продолжительного неконтролируемого приема антибиотиков широкого спектра действия) [3].

Известно, что одним из пусковых механизмов функционально-метаболических нарушений является декомпенсация антиоксидантной защиты организма, которая регулирует процессы перекисного окисления липидов, уровень активных форм кислорода, являющихся повреждающими факторами [4]. Поэтому состояние системы антиоксидантной защиты (АОЗ) является важным фактором, влияющим на состояние микрофлоры.

Под действием ксенобиотиков на макроорганизм происходят изменения состава микрофлоры кишечника, которая в виде биопленки препятствует проникновению патогенов. Наряду с этим повышается уровень активных форм кислорода, интенсифицируются процессы перекисного окисления липидов, наблюдается развитие общего неспецифического адаптационного стресса, что влечет за собой повреждение клеточных мембран [2].

В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования явилось изучение изменений состава микробиоценоза толстого кишечника животных и молекулярно-биохимических показателей плазмы крови и колоноцитов в условиях экспериментального лекарственного дисбиоза, возможности их коррекции с использованием пробиотика.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили на 150 мышах линии BALB/с массой тела 18-20 граммов. Для решения поставленных задач животные были разделены на 3 группы (по 50 мышей в каждой). Первая группа — контрольная (интактные мыши). Вторую группу составили животные, у которых моделировали лекарственный дисбиоз путем однократного ежедневного (в течение 5 дней) внутрибрюшинного введения раствора гентамицина. В третью группу входили мыши, которым по окончании введения антибиотика интрагастрально вводили пробиотик РиоФлора Иммуно Нео в течение трех недель.

По окончании сроков эксперимента изучали количественный и качественный состав микробиоценоза муцинового слоя толстого кишечника, состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в плазме крови и ткани толстого кишечника мышей: количественное определение ферментов каталазы и супероксиддисмутазы (СОД); количественное определение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА).

Количественное и качественное исследование мукозной микрофлоры толстого кишечника мышей проводилось по методике Кафарской Л.И. и Коршунова В.М. [1, 8]. С целью определения продуктов ПОЛ и ферментов АОЗ макроорганизма использовали традиционные методики [6, 7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальный дисбиоз толстого кишечника, обусловленный введением гентамицина, характеризовался уменьшением численности доминантных представителей микрофлоры интактных животных (табл. 1).

Содержание бифидобактерий снизилось в 1,9 раза и составило  $\lg 4,24 \pm 0,72$ . Количество кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью и лактобацилл уменьшилось в 1,7 раза и составило  $\lg 3,95 \pm 0,53$  и  $\lg 3,73 \pm 0,77$  соответственно. При этом число эшерихий со сниженной фермента-

Таблица 1. Влияние пробиотика РиоФлора Иммуно Нео на состав мукозной микрофлоры толстого кишечника мышей

Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов, lg КОЕ/г (M±m)		
	Группы животных		
	Контроль (интактные мыши)	Дисбиоз	Коррекция РиоФлора Иммуно Нео
<i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью	6,77±0,78	3,95±0,53**	7,20±0,66 <sup>xxx</sup>
<i>E. coli</i> со сниженной ферментативной активностью	4,37±0,76	7,03±0,95*	2,67±0,61 <sup>xxx</sup>
<i>Enterobacter</i> spp.	4,47±0,79	2,37±0,56*	5,92±0,74 <sup>xxx</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	5,65±0,66	6,44±0,86	3,97±0,81 <sup>x</sup>
<i>Citrobacter</i> spp.	4,37±0,92	0±0 <sup>***</sup>	3,78±0,79 <sup>xxx</sup>
<i>Enterococcus</i> spp.	3,42±0,90	0±0 <sup>***</sup>	4,71±0,79 <sup>xxx</sup>
<i>Streptococcus</i> spp.	2,93±0,60	6,17±1,09*	3,48±0,49 <sup>x</sup>
<i>Staphylococcus</i> (коагулазоотрицательные)	2,74±0,60	4,10±0,75	3,02±0,70
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	3,40±0,62 <sup>***</sup>	2,31±0,62 <sup>***</sup>
<i>Proteus</i> spp.	0	4,01±0,66 <sup>***</sup>	2,60±0,58 <sup>***</sup>
<i>Candida</i> spp.	1,26±0,32	4,94±0,74 <sup>***</sup>	1,06±0,38 <sup>xxx</sup>
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,15±0,70	3,73±0,77*	6,43±0,90 <sup>x</sup>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,93±0,93	4,24±0,72**	8,20±1,22 <sup>xx</sup>

Примечание. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 по сравнению с контрольной группой; <sup>x</sup> p<0,05, <sup>xx</sup> p<0,01, <sup>xxx</sup> p<0,001 по сравнению с группой «дисбиоз».

тивной активностью увеличилось в 1,6 раза, lg КОЕ которых составил 7,03±0,95. Численность факультативных микроорганизмов — стрептококков возросла в 2,1 раза по отношению к контролю и составила lg 6,17±1,09. Содержание условно патогенных бактерий рода *Enterobacter* после воздействия антибиотика широкого спектра действия гентамицина уменьшилось в 1,9 раза и составило lg 2,37±0,56. В составе микробиоценоза данной экспериментальной группы не выявлено бактерий рода *Citrobacter* и *Enterococcus*, тогда как отмечалось появление отсутствующих в контроле золотистых стафилококков и бактерий рода *Proteus*, lg КОЕ которых составил 3,40±0,62 и 4,01±0,66 соответственно.

На фоне применения гентамицина в составе микробиоценоза толстого кишечника мышей количество грибов рода *Candida* увеличилось в 3,9 раза и составило lg 4,94±0,74. Что касается коагулазотрицательных стафилококков и сальмонелл, то изменения их численности были недостоверны по отношению к контролю.

При использовании пробиотика РиоФлора Иммуно Нео численность бифидо- и лактобацилл возросла и превысила значения определяемого показателя в группе «дисбиоз» в 1,9 и 1,7 раза соответственно. В биоценозе кишечника мышей, получавших данный препарат, численность эшерихий с нормальной ферментативной активностью составила lg 7,20±0,66, что в 1,8 раза превысило их количество в экспериментальной группе «дисбиоз», и при этом достигла показателя контроля. Кишечные палочки со сниженной ферментативной активностью были обнаружены в количестве lg 2,67±0,61, что в 2,6 раза меньше значения определяемого показателя в группе «дисбиоз» и 1,6 в раза в контрольной группе. Увеличилось количество КОЕ бактерий рода *Enterobacter*, lg КОЕ которых составил 5,92±0,74, что было в 2,5 раза выше, чем в группе экспериментального дисбиоза, и превысило показатель в контрольной группе. *Citrobacter* spp. и *Enterococcus* spp., не выявленные при дисбиозе, были идентифицированы в количестве lg 3,78±0,79 и lg 4,71±0,79 соответственно. Количество стрептококков снизилось в 1,8 ра-

за, но не достигло значения определяемого показателя в группе интактных животных. Показатель КОЕ/г для золотистых стафилококков и бактерий рода *Proteus* снизился в 1,5 раза в сравнении с опытной группой гентамицинового дисбиоза, но не достиг контрольных значений, где данные представители отсутствовали. Количество сальмонелл после коррекции снизилось в 1,6 раза, но определяемый показатель не достиг значе-

ний группы интактных животных. Lg КОЕ грибов рода *Candida* снизился в 4,7 раза и достиг значения, близкого контролю. Изменение количества коагулазоотрицательных стафилококков было ниже уровня достоверности.

При изучении активности ферментов системы антиоксидантной защиты макроорганизма были получены следующие результаты (табл. 2).

В контрольной группе животных активность каталазы в плазме крови составила  $12,86 \pm 0,87$ , в ткани кишечника —  $14,11 \pm 0,88$ , активность СОД —  $14,24 \pm 1,03$  и  $14,23 \pm 1,03$  соответственно.

Полученные данные показывают, что у мышей при экспериментальном дисбиозе отмечается снижение активности изученных ферментов: каталазы и СОД в плазме крови в 1,3 раза и 1,2 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. В ткани кишечника обнаружено достоверное снижение данных показателей в 1,4 и 1,8 раза соответственно.

Применение пробиотика РиоФлора Иммуно Нео с целью коррекции гентамицинового дисбиоза привело к достоверному увеличению содержания СОД в ткани кишечника мышей в 1,6 раза, однако данный показатель не достиг значений определяемого показателя в контрольной группе. Изменения содержания каталазы были недостоверны.

Анализируя данные, полученные при изучении продуктов перекисного окисления липидов (табл. 3), мы отметили, что содержание МДА в плазме крови составило  $2,46 \pm 0,95$ , в ткани кишечника —  $3,57 \pm 0,57$ , содержание АГП —  $0,81 \pm 0,09$  и  $0,31 \pm 0,03$  соответственно.

После введения гентамицина у животных проис-

Таблица 2. Активность ферментов АОЗ в условиях экспериментального дисбиоза и его коррекции пробиотиками

Группы животных	Активность каталазы (M±m)		Активность супероксиддисмутазы (M±m)	
	Плазма, мкат/мл	Гомогенат ткани кишечника, мкат/г белка ткани	Плазма, у.е.	Гомогенат ткани кишечника, у.е
Контроль (интактные мыши)	$12,86 \pm 0,87$	$14,11 \pm 0,88$	$14,24 \pm 1,03$	$14,23 \pm 1,03$
Дисбиоз	$10,20 \pm 0,78^*$	$10,12 \pm 1,62^*$	$11,50 \pm 0,77^*$	$7,79 \pm 1,22^{***}$
Коррекция РиоФлора Иммуно Нео	$12,24 \pm 0,95$	$12,15 \pm 0,64$	$12,33 \pm 1,06$	$12,63 \pm 1,01^{xx}$

Примечание. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой; xx  $p < 0,01$  по сравнению с группой «дисбиоз».

Таблица 3. Содержание продуктов ПОЛ в условиях экспериментального дисбиоза и его коррекции пробиотиками

Группы животных	Содержание малонового диальдегида, мкмоль/г ткани (M±m)		Содержание ацилгидроперексидей, у.е (M±m)	
	Плазма, мкат/мл	Гомогенат ткани кишечника, мкат/г белка ткани	Плазма, у.е.	Гомогенат ткани кишечника, у.е
Контроль (интактные мыши)	$2,46 \pm 0,95$	$3,57 \pm 0,57$	$0,81 \pm 0,09$	$0,31 \pm 0,03$
Дисбиоз	$3,95 \pm 0,41^{**}$	$6,82 \pm 0,72^{***}$	$1,13 \pm 0,07^{**}$	$0,70 \pm 0,08^{***}$
Коррекция РиоФлора Иммуно Нео	$3,68 \pm 0,26^{**}$	$3,26 \pm 0,20^{xxx}$	$0,95 \pm 0,19$	$0,52 \pm 0,06^{**}$

Примечание. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой; xxx  $p < 0,001$  по сравнению с группой «дисбиоз».

ходило увеличение концентрации продуктов ПОЛ в плазме крови и ткани кишечника. При этом содержание МДА увеличивалось в 1,6 раза в плазме крови и в 1,9 раза в колоноцитах; АГП — в 1,4 раза в плазме крови и 2,3 раза в колоноцитах относительно контрольных величин.

При изучении влияния пробиотика РиоФлора Иммуно Нео на содержание продуктов ПОЛ было выявлено снижение количества МДА в колоноцитах в 2,1 раза при сравнении со значениями у мышей в группе «дисбиоз». Отмечено, что полученные значения превосходят соответствующие показатели в контрольной группе.

Таким образом, воздействие антибиотика широкого спектра действия (гентамицина) привело к существенным изменениям в составе кишечного микробиоценоза, так как были зарегистрированы качественные и количественные изменения состава микрофлоры. А именно, отмечено снижение количества бифидобактерий, лактобацилл, микроорганизмов рода *Enterobacter*. Представители родов *Citrobacter* и *Enterococcus* не идентифицировались. Одновременно со снижением количества кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью возросло количество эшерихий со сниженной ферментативной активностью, стрептококков, грибов рода *Candida*. При этом в составе микробиоценоза толстого кишечника обнаруживались золотистые стафилококки и протей.

Гентамициновый дисбиоз толстого кишечника сопровождался снижением активности антиоксидантных ферментов в плазме крови и ткани кишечника (каталаза, СОД), указывающих на напряженность их антирадикальной защиты. Динамика данных показателей в ткани кишечника может быть результатом воздействия качественных и количественных изменений состава кишечной микрофлоры на метаболизм колоноцитов, которые и являются непосредственно контактирующей зоной с микроорганизмами. Важно отметить тот факт, что микроорганизмы способны выделять в окружающую среду жирные кислоты, свободные радикалы, пероксиды, в результате чего происходит накопление продуктов их метаболизма, обладающих токсическим действием на различные биологические системы макроорганизма [10].

Увеличение концентрации продуктов перекисного окисления липидов в колоноцитах свидетельствует о степени риска нарушения целостности клеточных мембран непосредственно в зоне обитания микроорганизмов и обусловлено как действием самого антибиотика, так и увеличением численности стрептококков, золотистых стафилококков, протей, грибов рода *Candida* в результате развития дисбиоза.

Достоверно высокое содержание МДА и АГП может указывать на возможное повреждение клеточных мембран, которое сочетается со снижением активности каталазы и СОД относительно контрольных значений.

Использование пробиотика РиоФлора Иммуно Нео привело к восстановлению микробного равновесия (бифидобактерий, лактобацилл, кишечных палочек с нормальной и сниженной ферментативной активностью, сальмонелл, стрептококков, бактерий родов *Enterococcus*, *Enterobacter* и *Citrobacter*, грибов рода *Candida*) в толстом кишечнике экспериментальных животных.

При этом использование пробиотика оказало положительное влияние на активность фермента СОД колоноцитов, стабилизацию содержания МДА в ткани толстого кишечника, что может быть результатом восстановления микробного равновесия в микробиоценозе кишечника.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Богданова Е.А., Несвижский Ю.В., Воробьев А.А. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта крыс при пероральном введении пробиотических препаратов. Вестн. РАМН. 2006, 2: 6-10.
2. Зоров Д.Б. и др. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота. Биохимия. 2005, 70 (2): 265-272.
3. Завгородняя Е.Ф. Особенности микробиологической характеристики дисбиозов кишечника в современных условиях. Дальневост. журн. инфекц. патологии. 2008, 12: 161-162.
4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимические и патофизиологические аспекты М.: Наука/Интерпериодика, 2001.
5. Костюкевич О.И. Современное представление о микробиоценозе кишечника. Дисбактериоз и его коррекция. РМЖ. 2007, 28: 2176-2182.
6. Королюк М.А. и др. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988, 1: 16-19.
7. Макаренко Е.В. Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах больных с хроническими заболеваниями печени. Лаб. дело. 1988, 11: 48-50.
8. Несвижский Ю.В. и др. Микробиоценоз пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс с индуцированным дисбиозом Журн. микробиол. 2007, 3: 57-60.
9. Несвижский Ю.В. Изучение изменчивости кишечного микробиоценоза человека в норме и патологии. Вестн. РАМН. 2003, 1: 49-53.
10. Шишкина Л.Н. Особенности функционирования физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов в биологических объектах разной степени сложности в норме и при действии повреждающих факторов. Дис. д-ра хим. наук. М., 2003.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Е.Г.Семин, Л.Н.Синяшина, А.Ю.Медкова, Г.И.Каратаев*

## КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АТТЕНУИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA PERTUSSIS* ГЕНОТИПА PtxP3

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

*Цель.* Конструирование рекомбинантных бактерий *B. pertussis* генотипа ptxP3 и характеристика их генетической и биологической стабильности. *Материалы и методы.* В качестве реципиента при конструировании аттенуированных бактерий генотипа ptxP3 использованы вирулентные бактерии *B. pertussis* 475 генотипа ptxP1, применяемые для производства вакцины АКДС в Российской Федерации. Мутантные бактерии *B. pertussis* 475 получены в результате аллельного обмена между нативной копией целевой последовательности в составе хромосомы и ее мутантной копией в рекомбинантной суицидной плазмиде, переданной в реципиентную бактерию с помощью конъюгации. Конструирование рекомбинантных плазмид осуществлено стандартными методами генетической инженерии. Структура модифицированных участков хромосомы аттенуированных бактерий определена с помощью ПЦР и секвенирования фрагментов амплификации. Стабильность структуры и свойств аттенуированных бактерий определена после 15 пассажей бактерий на питательной среде и 5 — в организме мышей. *Результаты.* Сконструированы изогенные аттенуированные бактерии PtxP1 *B. pertussis* 4M и PtxP3 *B. pertussis* 4MKS, продуцирующие коклюшный токсин (КТ), лишенный ферментативной токсической активности, и не продуцирующие дермонекротический токсин. Промоторная область оперона ptx аттенуированных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS содержит мутацию, характерную для «нового» генотипа циркулирующих в настоящее время вирулентных бактерий *B. pertussis* и увеличивающую продукцию КТ. Структура модифицированных фрагментов ДНК и свойства аттенуированных бактерий