

ANDROTEST – у 27 (67.5%) и MMAS – у 24 (60%) больных.

Уровень общего Т менее 8 нмоль/л, либо рассчитанного свободного Т менее 225 пмоль/л (по рекомендациям международного консенсуса от 2008 г.) выявлен у 2 (5%) пациентов, еще у 8 (20%) не превышал 12 нмоль/л. У 11 больных показатель сывороточного Т составил от 12 до 16,5 нмоль/л, среди них у 9 (22,5%) выявлены клинические проявления ВГГ, то есть, был получен положительный тест по крайней мере по одному из вопросников. Соответственно, у 2 пациентов был установлен диагноз ВГГ, остальные 17 пациентов имели показания к пробной ЗГТ. На следующем этапе этим 19 пациентам было проведено лечение дериватами Т в течение 30 дней, после чего повторно проведено анкетирование по вопросникам ПЕФ-5, ADAM, AMS и ANDROTEST. Вопросник MMAS повторно не использовался, поскольку изначально он был разработан для оценки факторов риска возникновения ВГГ, и не включает симптоматики. Анкетирование после проведенного лечения продемонстрировало улучшение показателей по вопросникам. Улучшение теста по шкале ПЕФ-5 зафиксировано у 13 (68%) пациентов, ADAM – у 3 (16%), AMS – у 12 (63%), ANDROTEST – у 10 (52%).

С учетом результатов проведенного исследования, вопросник ADAM обладает максимальной чувствительностью для отбора пациентов, подлежащих дальнейшему обследованию. Использование вопросника AMS, основанного на симптоматике ВГГ с количественным анализом ее симптомов, позволяет оценить эффективность ЗГТ, и в первую очередь при назначении пациентам пробной заместительной терапии.

Наконец, применение вопросников, частично или полностью основанных на оценке факторов риска развития ВГГ (ANDROTEST, MMAS), помогает выработать тактику долгосрочного наблюдения больных. Эти валидные анкеты могут быть использованы в профилактических программах у мужчин после 40 лет или при проведении среди населения специ-

альных научно-популярных сообщений по вопросам мужского здоровья. Эти мероприятия помогут своевременно выявить и успешно лечить больных с целой группой неблагоприятных возрастных проявлений, существенно снижающих качество жизни.

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСА, НЕСУЩЕГО ГЕН ОМСВ CHLAMYDIA TRACHOMATIS, ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ХЛАМИДИОЗА

**Королева Е.А., Щербинин Д.Н.,
Шмаров М.М., Зигангирова Н.А.,
Народицкий Б.С.**

*Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи РАМН
Москва, Россия*

Введение

Разработка вакцинного препарата для лечения и профилактики урогенитального хламидиоза, который будет снижать риск развития хронических состояний, и препятствовать распространению инфекции в популяции, рассматривается в качестве наиболее эффективного средства по контролю за одной из самых распространенных инфекций передаваемых половым путем. Особенности биологии хламидий, связанные с облигатным внутриклеточным паразитированием, и индуцируемые возбудителем иммунопатологические состояния, серьезно осложняют разработки в этой области. В настоящее время не существует вакцинного препарата против урогенитального хламидиоза, который бы перешел на стадию клинических испытаний. Исследования по созданию противохламидийных вакцин, включают, в первую очередь, поиск перспективных кандидатных антигенных белков, проводимый на основе геномного и протеомного анализа, и выбор эффективных систем доставки. Известно, что целый ряд поверхностных и секретируемых

белков хламидий обладают хорошими иммуногенными свойствами при создании субъединичных вакцин. Одной из перспективных систем для доставки генетической информации, кодирующей гены инфекционных возбудителей, является система, основанная на аденовирусных векторах. Первые попытки использования аденовирусных векторов для иммунизации лабораторных животных против хламидиоза, была предпринята группой исследователей из Китая под руководством доктора Jizhang Zhou, в 2006 г. Эти первые данные демонстрируют, что аденовирусный вектор, несущий ген основного белка наружной мембраны, имеет хорошие перспективы использования для генетической иммунизации против хламидиоза.

Цель работы

Создание вакцинного препарата на основе рекомбинантного аденовируса, несущего ген *omcB* *C. trachomatis* (*Ad-mOmcB*) и изучение его иммуногенных свойств.

Материалы и методы

Все генно-инженерные манипуляции проводились по стандартным методам, изложенным в Maniatis et al. (1982). Все манипуляции, связанные с работой с аденовирусами, проводили согласно инструкции «AdEasy Adenoviral vector system» фирмы (Stratagen). Использовались стандартные плазмидные векторы pAL-TA (evrogen), плазмидная система pAd-Easy (Stratagen), плазмидный вектор pShuttle-CMV (Stratagen).

Оценку экспрессии белка *OmcB* *C. trachomatis* проводили методом: ОТ-ПЦР, непрямой иммунофлуоресценции в культуре клеток и методом иммуноблота. Для оценки экспрессии использовали клетки линии A549 (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells), которые трансдуцировали рекомбинантным аденовирусом, несущим модифицированный ген *omcB* (*tomcB*) *C. trachomatis*. Для постановки ОТ-ПЦР были подобраны специфические праймеры с помощью программы Primer 3 и Oligo 38. Для реакции иммунофлуоресценции и иммуноблота использовали

гипериммунную кроличью сыворотку против элементарных телец *C. trachomatis*. Для оценки гуморального иммунного ответа мышей линии BALB/c (10 мышей/группа), в возрасте 8 недель иммунизировали 2-хкратно интраназально и внутримышечно рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим белок *OmcB* *C. trachomatis* и неинфекционным аденовирусом (*Ad-null*) в качестве отрицательного контроля. Титры антител к антигену *OmcB* *C. trachomatis* анализировали методом микроиммунофлуоресценции с использованием в качестве антигена *C. trachomatis* культивируемую в культуре клеток McCoу в 96 луночных планшетах и зафиксированную через 48 ч. после заражения. Такой препарат позволял выявлять наружный белок *OmcB* *C. trachomatis* на поверхности элементарных телец в составе хламидийных включений.

Результаты и их обсуждения

В результате проделанной работы был проведен компьютерный анализ последовательности гена *omcB* *C. trachomatis*, найдена и удалена бактериальная сигнальная последовательность. В дальнейшем были оптимизированы кодоны в гене *omcB* для экспрессии в клетках *Mus musculus*. Модифицированный ген был синтезирован и клонирован в плазмиду pAL-TA. Затем ген *omcB* субклонировали в pShuttle под эукариотический промотор цитомегаловируса человека – CMV. Проведен анализ экспрессии гена *omcB* в составе рекомбинантного аденовируса тремя методами: ОТ-ПЦР, непрямой иммунофлуоресценции в культуре клеток, иммуноблота. Результаты показали специфическую экспрессию полученного гена *omcB* *C. trachomatis* в составе рекомбинантного аденовирусного вектора.

Мышей линии BALB/c (10 мышей/группа), в возрасте 8 недель 2-хкратно иммунизировали интраназально и внутримышечно. Для определения гуморального иммунного ответа были подобраны оптимальные способы введения вакцинной конструкции. На 21 и 56 день после последней иммунизации собирали сыворотку

для определения специфических антител. В результате было показано, что у групп мышей иммунизированных *Ad-mOmcB* интраназально и внутримышечно на всех сроках наблюдения выявлялись специфические антитела:

- у 83% мышей иммунизированных внутримышечно *Ad-mOmcB* титры на 21 день составили от 1:32 до 1:128. На 56 день эти же титры выявлялись у 75% иммунизированных животных;

- у 50% мышей иммунизированных внутримышечно *Ad-mOmcB* титры на 21 день составили от 1:32 до 1:128. На 56 день титры выявлялись уже у 75% иммунизированных животных;

- у групп мышей иммунизированных неинфекционным аденовирусом (*Ad-null*) титры не были выявлены.

Выводы

1. С использованием эффективной технологии получения рекомбинантных аденовирусов, впервые была получена аденовирусная конструкция, экспрессирующая модифицированный хламидийный белок *OmcB*.

2. Была показана экспрессия этого белка в культуре клеток, зараженных *Ad-mOmcB*.

3. Показана индукция гуморального иммунного ответа при иммунизации мышей рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующем при интраназальном и внутримышечном введении ген *omcB C. trachomatis*.

БИОЦЕНОЗ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА ПРИ ПАТОЛОГИИ ШЕЙКИ МАТКИ

**Коршукова О.А., Шаркова В.А.,
Башкирова Л.В.**

*Владивостокский государственный
медицинский университет
Клиника восстановления здоровья «ООО
Кораловый центр»
Владивосток, Россия*

Представление о нормальном биоценозе уrogenитального тракта позволяет более точно понять основные особенности его микросистемы в ответ на различные неблагоприятные воз-

действия (Хачатурян Р.Е., Линова В.А., 1989, Бухарин О.В, Литвин В.Ю., 1997; Степанова Ю.Н., 2003). Наличие условно-патогенной микробиоты определяется методом ПЦР. Однако, для назначения адекватного лечения необходимо определение количества патогенной микрофлоры. Фемофлор, как метод исследования, позволяет дать полную характеристику нормальной и условно-патогенной флоры: определить наличие, количество, степень и характер ее дисбаланса. Клиническое значение состояния биоценоза уrogenитального тракта женщины заключается в определении общего количества микроорганизмов и соотношений различных групп условно-патогенной и нормофлоры. Показатель нормоценоза - это соотношение лактобактерий и общей бактериальной массы. Цель исследования: определение биоценоза влагалищных выделений при патологии шейки матки для совершенствования диагностики уrogenитальных инфекционно-воспалительных заболеваний и рациональной терапии.

Было обследовано 160 женщин с различной патологией шейки матки. При дисплазии и эрозии шейки матки смешанный дисбиоз отмечался в 64% случаев. При этом выявлено 94% атопобиум вагине, 2% гарднерелл, 1% мегасферы, лактобактерии составили 3%. Умеренно увеличен уровень энтеробактерий, стафилококков, эубактерий, мобилунгус, диагностический уровень кандид. При эндоцервицитах и цервицитах картина умеренного дисбиоза наблюдалась в 26% случаев. Процентное соотношение микроорганизмов в исследуемом биоценозе составляло: 38% атопобиум вагине, лактобактерии 16%, умеренно увеличен уровень энтеробактерий, стафилококков, стрептококков, диагностический уровень кандид, микоплазм.

Таким образом, состояние биоценоза уrogenитального тракта при патологии шейки матки дает возможность применять этиологически направленную терапию, избегать полипрагмазии, проконтролировать восстановление нормальной флоры уrogenитального тракта.