

для культивирования клеток млекопитающих. Патент РФ № 2377295, 2009.

3. Онищенко Г.Г., Сергеев А.Н., Скарнович М.О., Агафонов А.П., Стодольский И.М., Мистюрин Ю.Н., Гуськова Н.В., Дроздов И.Г. Адсорбционно-криогенный аппарат для сублимационного высушивания биологических материалов. Патент № 55949, 2006.

4. Методические рекомендации по контролю качества вирусологических питательных сред. – М., 1985. – 14 с.

5. Вирусология. Методы / пер. с англ. Б. Мейхи. – М.: Мир; 1988. – 344 с..

6. И-42-2-82. Инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода «ускоренного старения» при повышенной температуре. – М., 1983. – 13 с.

7. Звягин И.В., Хорьков И.А., Токарик Э.Ф. и др. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов. – М: Изд-во Минсельхоз СССР, 1981. – 35 с.

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А/Н3N2

Мазуркова Н.А.

*ФГУН ГНЦ вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

Роспотребнадзора,

*р.п. Кольцово, Новосибирской области,
e-mail: troshkova@vector.nsc.ru*

Успехи в определении аминокислотной последовательности, пространственной и антигенной структуры белков стимулировали интерес к использованию в качестве антигенов синтетических пептидов, имеющих последовательность антигенных сайтов вирусных белков [1]. Конъюгаты таких пептидов с высокомолекулярными носителями при введении в организм млекопитающего могут вызвать иммунный ответ против инфекционного агента. В связи с этим в 80-е годы возникло новое направление по созданию биосинтетических вакцин на основе пептидных фрагментов, соответствующих аминокислотной последовательности тех структур вирусного (бактериального) белка, которые распознаются иммунной системой и вызывают иммунный ответ. В настоящее время в литературе сообщается

о многочисленных примерах успешного создания синтетических препаратов, способных индуцировать наработку в организме животных нейтрализующих антител к ряду вирусов, в том числе и к вирусу гриппа [2].

Основной мишенью для нейтрализующих антител у вируса гриппа является тяжелая цепь (НА1) гемагглютинаина. При этом показано, что иммунный ответ направлен против отдельных элементов цепи НА1, так называемых антигенных сайтов. Исследованием антигенных и иммуногенных свойств синтетических пептидных фрагментов НА вируса гриппа занимаются ученые в разных странах [2], однако сопоставить полученные ими данные нелегко, так как при изучении одних и тех же антигенных сайтов авторы использовали пептиды разной длины и аминокислотной последовательности, применяли неодинаковые носители, способы конъюгации, а также схемы иммунизации. Следует также отметить, что в большинстве работ авторы ограничивались оценкой способности антипептидных антител связываться с НА или вирусом в методе иммуноферментного или радиоиммунного анализа и не исследовали антигемагглютинирующие и нейтрализующие свойства полученных антител.

Цель настоящей работы – исследование иммуногенных свойств синтетических пептидов, соответствующих некоторым предполагаемым антигенным сайтам НА вируса гриппа А/Н3N2, конъюгированных с белком-носителем – бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Материалы и методы

В работе использовали вирус гриппа А/Aichi/2/68 (Н3N2), полученный из музея вирусов ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Иванова РАМН, Москва.

Использовали синтезированные в лаборатории ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под руководством В.В. Самукова пептиды, соответствующие участкам 122-133 (Thr Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Cys¹), 136-147 (Ser Asn Ala Cys Lys Arg Gly Pro Gly Ser Gly Phe), 154-164 (Leu Thr Lys Ser Gly (или Glu) Ser Thr Tyr Pro Val leu Cys) [3]. Через имеющиеся в составе или искусственно введенные остатки цистеина (Cys¹) пептиды были конъюгированы с БСА с помощью бифункционального сшивающего реагента N-оксисукцинимидного эфира 3-(2-пиридилдитио)-пропионовой кислоты (SPDP) [3].

Для постановки реакции нейтрализации (РН) использовали линию клеток MDCK – клетки почки взрослой самки кокер – спаниеля

из коллекции культур клеток ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва. Клетки культуры выращивали на пластиковых культуральных 96-луночных планшетах («Corning», США). Кроме клеток MDCK для проведения РН использовали растущие куриные эмбрионы (РКЭ).

Антипептидные сыворотки получали путем иммунизации кроликов массой 2 кг и морских свинок массой 250-300 г конъюгатами пептид-БСА, как описано ранее [4]. Полученные сыворотки прогревали в течение 30 мин при 56 °С и обрабатывали RDE для удаления ингибиторов в соответствии с инструкцией производителя.

Реакцию нейтрализации (РН) проводили на культуре клеток MDCK, как описано [5] (для кроличьих сывороток), или на РКЭ (для кроличьих сывороток и сывороток морских свинок). Для постановки РН 10-кратные разведения суспензии вируса смешивали с равными объемами неразведенных декомплементированных сывороток. В качестве контрольных сывороток в РН использовали нормальные сыворотки животных и сыворотки, полученные к БСА, ацилированному SPDP.

Математическую обработку результатов проводили с использованием общепринятых статистических методов. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Приблизительная локализация антигенных сайтов НА штамма A/Aichi/2/68 была установлена на основании анализа антигенного дрейфа вируса гриппа A/H3N2 [6], методов химической модификации [7] и изучения антигенных вариантов, отобранных с помощью моноклональных антител (МКА) [8]. В соответствии с этой структурой пептиды 122-133 и 136-147 составляют вместе почти полный антигенный сайт А (район «петли»). Пептид 154-164, являющийся частью сайта В, синтезирован в двух вариантах – (154-164)Gly и (154-164)Glu, так как для НА A/Aichi/2/68 известны первичные структуры, содержащие как Gly, так и Glu в положении 158. Кролики и морские свинки были иммунизированы пептидами, конъюгированными с БСА, как описано в разделе «Условия эксперимента». Сыворотки к пептидам 136-147 и 154-164 проявили отчетливые антигемагглютинирующие свойства, причем сыворотки морских свинок имели в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) значительно более высокие титры (1:512-1:1024), чем сыворотки кроликов (1:20-1:40). Максимальные значения титров на

обеих биологических моделях были получены для пептида 136-147. Во всех случаях торможение гемагглютинации специфически подавлялось при добавлении к исследуемым сывороткам гомологичных конъюгатов. В РТГА со штаммом другого подтипа – A/PR/8/34 (H1N1), взятым в качестве контроля, не реагировала ни одна из антипептидных сывороток.

Известно, что важным фактором в характеристике эффективности проведенной иммунизации является определение вируснейтрализующей активности полученных сывороток. Изучение вируснейтрализующих свойств антипептидных сывороток показало, что кроличьи сыворотки анти-(136-147) и анти-(154-164) (оба варианта) проявляют активность в РН на культуре клеток MDCK (индексы нейтрализации (ИН) составляли 2,0, 2,5 и 3,0 для сывороток анти-(154-164)Gly, анти-(154-164)Glu и анти-(136-147), соответственно). Аналогичные данные были получены для сывороток морских свинок в РН на РКЭ. Сыворотка анти-(154-164)Gly нейтрализовала 1,0 Ig, анти-(154-164)Glu – 2,3 Ig, а наиболее активная сыворотка анти-(136-147) – 4,0 Ig вируса A/Aichi/2/68. Различие в нейтрализующей активности сывороток анти-(154-164)Gly и анти-(154-164)Glu не вполне понятно. Можно лишь предположить наличие в положении 158 первичной структуры НА использованного нами штамма вируса гриппа A/Aichi/2/68 аминокислотного остатка глицина, а не глутаминовой кислоты.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что короткие синтетические фрагменты тяжелой цепи НА штамма A/Aichi/2/68, то есть пептиды 136-147 и 154-164, способны индуцировать в организме животных выработку антител, обладающих специфической антигемагглютинирующей и нейтрализующей активностью по отношению к гомологичному вирусу. Наши данные согласуются с результатами, представленными в работе Shapira M. и соавт. [9], в которой была показана вируснейтрализующая активность антител, полученных к пептидам из региона «петли» НА штамма A/Англия/42/72 (H3N2).

Следует отметить, что и в наших исследованиях, и в исследованиях группы Н. Грина [10] титры антипептидных сывороток в РН всегда были меньше, чем титры антивирусных сывороток (в наших опытах ИН для антивирусных сывороток, полученных на кроликах и морских свинках, составляли 6,5 и 7,5 Ig, соответственно). Вероятно, это связано, во-первых, с ограничением в антипептидной сыворотке пропорции нужных антител, а, во-вторых, с тем, что в анти-

вирусной сыворотке содержатся еще другие антитела, в частности, к нейраминидазе, которые, как известно, могут увеличивать нейтрализующую активность антивирусной сыворотки [11]. Наши результаты подтверждают правильность предположения, высказанного ранее в одной из работ [12], что более слабый защитный эффект синтетической вакцины против вируса гриппа в сравнении с цельновиральной был обусловлен в числе других факторов и тем обстоятельством, что вакцина содержала только один тип антигенной детерминанты, хотя и многократно повторенной в результате конъюгирования с носителем. Грин и соавт. [10] также считают, что более эффективными иммуногенами являются мультивалентные синтетические антигены.

В заключении необходимо отметить, что в настоящее время синтетические вакцины менее эффективны, по сравнению с традиционными, так как многие участки вирусов проявляют вариабельность в плане иммуногенности и дают меньшую иммуногенность, нежели нативный вирус. Однако данное направление является весьма перспективным и обнадеживающим, в связи с чем ВОЗ одобрила рекомендации по разработке и контролю синтетических пептидных вакцин [13]. В синтетических пептидных вакцинах использование одного или двух иммуногенных белков вместо целого возбудителя обеспечивает формирование иммунитета при значительном снижении реактогенности вакцины и ее побочного действия. А усиление иммуногенности синтетической вакцины может быть достигнуто при сочетанном ее применении с индукторами интерферона и иммуномодуляторами. Поэтому поиск оптимальных индукторов интерферона и иммуномодуляторов может оказаться перспективным для совершенствования вакцинопрофилактики гриппа с помощью синтетических пептидов.

Список литературы

1. Sela M. From synthetic antigens to synthetic vaccines // *Biopolymers*. – 1983. – №22. – С. 415-424.
2. Adar Y., Singer Y., Levi R., Tzeval E., Perk S., Banet-Noach C., Nagar S., Arnon R., Ben-Yedidia T. A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy against H5N1 // *Vaccine*. – 2009. – №26, 27 (15). – С. 2099-2107.
3. Самуков В.В., Калашников В.В., Офицеров В.И., Швалье А.Ф. Синтез пептидных фрагментов гемагглютинаина вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) // *Биоорганическая химия*. – 1985. – №11 (8). – С. 1037-1047.
4. Самуков В.В., Мазуркова Н.А., Калашников В.В., Офицеров В.И., Швалье А.Ф., Мизен-

ко Г.А., Ерошкин А.М., Подчерняева Р.Я. Антигенные свойства синтетических фрагментов тяжелой цепи гемагглютинаина вируса гриппа А // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 1988. – №7. – С. 35-39.

5. Смородинцев А.А. Иммунологическая диагностика вирусных инфекций. Перадзе Т.В., Халонен П.М. – 1985. – №21. – С. 46.

6. Webster R.G., Laver W.G., Air G.M., Schild G.C. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses // *Nature*. – 1982. – №296. – С. 115-121.

7. Laver W.G., Air G.M., Webster R.G. Replication of Negative Strand Viruses / Eds D.H. L. Bishop, R.W. Compans. – New York, 1981. – С. 421-425.

8. Jackson D.C., Nestorowicz A. Antigenic determinants of influenza virus haemagglutinin. XI. Conformational changes detected by monoclonal antibodies // *Virology*. – 1985. – №145. – С. 72-83.

9. Shapira M., Misulovin Z., Arnon R. Specificity and cross-reactivity of synthetic peptides derived from a major antigenic site of influenza haemagglutinin // *Mol. Immunol.* – 1985. – №22. – С. 23-28.

10. Green N., Alexander S. Broad spectrum influenza antisera // *Biotechnol. Adv.* – 1987. – №5 (1). – С. 182.

11. Huang R.T.C., Rott R., Wahn K., Klenk H.D., Kohama T. Function neuraminidase in membrane fusion induced by myxoviruses // *Virology*. – 1981. – №107. – С. 313-319.

12. Muller G.M., Shapira M., Arnon R. Anti-influenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1982. – №79. – С. 569-573.

13. Guidelines for the production and quality control of synthetic peptide vaccines // *Geneva*. – 1997. – TRS № 889.

КОРРЕКЦИЯ ДИАБЕТИЧЕСКОГО ГИПЕРГЛИКЕМИЧЕСКОГО КЕТОАЦИДОЗА

^{1,2}Моргунов С.С., ¹Матвеев А.В.,
²Ситдиков Ф.Л., ²Палехова Л.С.,
²Агеев Д.П., ³Дымов Л.Ю.

¹ГОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия»;

²МУЗ 2-я ГКБ, Ижевск;

³ПЦ МЗ УР, e-mail: morser@udmnet.ru

Диабетический гипергликемический кетоацидоз (ДГКА), как результат тяжелого осложнения сахарного диабета (СД), представляет