

заболеваемости необходимо проведение ранней этиологической диагностики и назначение своевременного лечения с помощью этиотропных препаратов, в спектре которых эффективными являются арбидол, ингавирин, озельтамивир (Тамифлю™) и занамивир (Реленза™).

ЛИТЕРАТУРА

1. Козулина И.С., Самсыгина Г.А., Исаева Е.И., Легкова Т.П., Шевченко Н.Н., Донин И.М., Павлов С.А. Бокавирус – новый инфекционный агент в этиологии острых респираторных заболеваний в детском возрасте. Педиатрия. 2009; 88 (6).
2. Львов Д.К., ред. Медицинская вирусология: Руководство. М.: МИА; 2008.
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г. и др. Возможная связь летальной пневмонии с мутациями пандемического вируса гриппа А/Н1N1 sw1 в рецепторсвязывающем сайте субъединицы HA1 гемагглютинаина. Вопросы вирусологии. 2010; 4: 4–9.
4. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А(Н1N1) в России. Вопросы вирусологии. 2010; 55 (3): 4–9.
5. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г. и др. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ N.2452 от 24.05.2009) первого штамма А/IV-Moscow/01/2009 (Н1N1)sw1, подобного свиному вирусу А(Н1N1) от первого выявленного 21.05.2009 больного в Москве. Вопросы вирусологии. 2009; 5: 10–4.
6. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация: Методические рекомендации. (Утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 18 апреля 2006 г. № 0100/4430-06-34). М.; 2006.
7. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О совершенствовании системы эпидемиологического надзора и контроля за гриппом и

- острыми респираторными вирусными инфекциями» № 373 от 31.03.2007 г. М.; 2007.
8. Носов С.Д., ред. Руководство по инфекционным болезням у детей. М.: Медицина; 1972.
9. Сергеев Н.В., Лейтис Ф.А. Поражение сердечно-сосудистой системы при гриппе. М.: Медгиз; 1962.
10. Bhat N., Wright J.G., Broder K.R., Murray E.L., Greenberg M.E., Glover M.J. et al. Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003–2004. N. Engl. J. Med. 2005; 353: 2559–67. DOI:10.1056/NEJMoa051721.
11. Cao B., Li X.W., Mao Y., Wang J., Lu H.Z., Chen Y.S. et al. National Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Clinical Investigation Group of China. Clinical features of the initial cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in China. N. Engl. J. Med. 2009; 361 (26): 2507–17.
12. Centers for Diseases Control and Prevention. Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) – United States, May–August 2009. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 2009; 58: 1–4.
13. <http://emedicine.medscape.com/article/1355393>overview>
14. Murray C.J., Lopez A.D., Chin B., Feehan D., Hill K.H. Estimation of potential global pandemic influenza mortality on the basis of vital registry data from the 1918–20 pandemic: a quantitative analysis. Lancet. 2006; 368: 2211–8. DOI:10.1016/S0140-6736(06)69895-4.
15. Peebles P.J., Dhara R., Brammer L., Fry A.M., Finelli L. Influenza associated mortality among children – United States: 2007–2008. Influenza and Other Respiratory Viruses. 2011; 5: 25–31.
16. Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. J. Infect. Dis. 2008; 198: 962–70. DOI: 10.1086/591708.
17. Gupta R.K., George R., Nguyen-Van-Tam J.S. Bacterial pneumonia and pandemic influenza planning. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14 (8). www.cdc.gov/eid

Поступила 31.05.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013
УДК 578.832.1:578.11.083.3

Л.А. Степанова¹, А.А. Ковалева¹, М.В. Потанчук¹, А.В. Коротков¹, В.В. Курпrianov², Е.А. Блохина²,
Р.Ю. Котляров², Л.М. Цыбалова¹

Иммуногенные свойства рекомбинантных белков, включающих эктодомен белка M2 вируса гриппа А

¹ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург; ²Центр «Биоинженерия» РАН, Москва

Создано 2 рекомбинантных белка, включающих 3 пептида M2e вирусов гриппа: А (H1N1)pdm09, A/Kurgan/05/05 (H5N1) и консенсусная аминокислотная последовательность M2e вирусов гриппа А человека на основе белковых носителей флагеллина и соге-антигена вируса гепатита В (HBc); в состав второго препарата включен флагеллин в качестве адъюванта. Проведено сравнение иммуногенности двух препаратов. Ковалентная сшивка флагеллина с M2e значительно усиливает иммуногенность целевого белка по сравнению с комплексом белков ЗМР + HBc + FlgP, образованным за счет нековалентных взаимодействий *in vitro*. Получены данные о влиянии белкового носителя на синтез подклассов анти-M2e иммуноглобулинов класса G. Флагеллин как белковый носитель M2e стимулирует преимущественно образование иммуноглобулинов подкласса G1, тогда как HBc вызывает более сбалансированный Th1/Th2 ответ. Выявлено снижение репродукции вируса в легких иммунизированных мышей после заражения летальной дозой вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1). Показана возможность получения вакцинного препарата, обладающего одновременно одинаковой иммуногенностью как против вирусов гриппа А человека, так и против высокопатогенных вирусов гриппа птиц.

Ключевые слова: грипп, рекомбинантные белки, M2e, HBc, флагеллин, иммунный ответ

Контактная информация:

Степанова Людмила Алексеевна, канд. биол. наук; e-mail: stepanova60@mail.ru

Immunogenicity of Recombinant Proteins Including Ectodomain of M2 Influenza Virus A

L. A. Stepanova¹, A. A. Kovaleva¹, M. V. Potapchuk¹, A. V. Korotkov¹, V. V. Kupriyanov², E. A. Blokhina², R. Yu. Kotlyarov², L. M. Tsybalova²

¹Federal State Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia; ²Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Two recombinant proteins with three copies of the ectodomain of the conserved influenza protein M2 (M2e) of influenza viruses were developed: A (H1N1)pdm09, A/Kurgan/05/05 (H5N1), and M2e consensus sequence of the human influenza A virus (H1N1, H2N2, H3N2) based on flagellin and core antigen of hepatitis B (HBc). The first recombinant protein comprised flagellin fused to three tandem copies of M2e, the second preparation was based on non-covalent interaction between M2e peptides and HBc. The immunogenicity of two preparations was comparatively tested. A covalent linkage of flagellin with M2e significantly increased the immunogenicity of the target antigen compared with non-covalent interaction M2e and HBc. Flagellin as a protein carrier of M2e induced mainly IgG1 subclass, whereas HBc stimulated more balanced Th1/Th2 response. Our study showed a decrease in the viral titers in lung tissues of immunized mice after lethal challenge of A/PR/8/34 (H1N1). The study revealed a possibility to obtain a vaccine preparation with equal immunogenicity both against human influenza viruses and highly pathogenic avian influenza viruses.

Key words: influenza, recombinant proteins, M2e, HBc, flagellin, immune response

Консервативные белки вируса гриппа (M2, HA2, M1, NP) вызывают повышенный интерес исследователей как объект разработки рекомбинантных вакцин нового поколения [3, 5, 10, 16]. Ряд рекомбинантных вакцин на основе эктодомена белка M2 (M2e) вируса гриппа успешно прошли доклинические испытания и клинические испытания фазы I, II. Показана их безопасность и высокая иммуногенность [7, 17, 19, 20]. Пептид M2e практически идентичен для всех вирусов гриппа, циркулировавших в человеческой популяции, включая пандемические вирусы А/Сингапур/1/57 (H2N2) и А/Гонконг/1/68 (H3N2), вызвавшие пандемии соответственно в 1957 и 1968 гг., что и создает предпосылки для разработки универсальной вакцины на его основе. Вместе с тем аминокислотная последовательность M2e вируса гриппа А/H1N1/pdm09 и высокопатогенного вируса гриппа птиц А/H5N1 отличается от таковой вирусов гриппа человека на несколько аминокислот и индуцирует слабый перекрестный ответ.

Пептид M2e является слабым иммуногеном, что, видимо, связано с его малым размером (24 а. к.) и низкой плотностью на вирусной мембране. Введение M2e с адьювантом или M2e, конъюгированного с белковым носителем, однако, стимулирует образование специфических антител, которое коррелирует с защитой от заражения летальной дозой вируса [1, 2, 4, 7, 9, 13, 15].

Перспективными белковыми носителями для слабоиммуногенных антигенов являются бактериальный белок флагеллин – лиганд toll-like 5 рецептора (TLR5) и core-антиген вируса гепатита В (HBc). Флагеллин посредством активации TLR5 является мощным индуктором врожденного иммунитета, стимулирует созревание дендритных клеток с последующим усилением адаптивного иммунитета и может быть использован одновременно как белковый носитель и адьювант при создании противовирусных вакцин на его основе [6, 11, 13]. Белок HBc способен к самосборке в вирусоподобные частицы. Химерные частицы HBc-антигена, экспонирующие на своей поверхности чужеродные эпитопы, индуцируют высокий иммунный ответ на встроенные пептиды и защищают экспериментальных животных от заражения патогеном [1, 4, 9, 10, 18]. Встраивание пептидов в HBc возможно на “генетическом” уровне либо *in vitro*, в результате нековалентного связывания с немодифицированными HBc частицами [4].

Целью настоящей работы были конструирование и оценка иммуногенности двух рекомбинантных белков, включающих M2e разных субтипов вирусов гриппа А на основе белковых носителей (HBc, флагеллин) при парентеральном введении.

Материалы и методы

Конструирование экспрессионного вектора pQE30-flg-3M, выделение и очистка рекомбинантного белка Flg-3M. Для создания экспрессионного вектора, обеспечивающего продукцию флагеллина с присоединенными к нему тремя копиями M2e, была использована плаزمиды pQE30-3MP [3], в которой клонирован искусственный ген, кодирующий гибридный белок, включающий 2 копии M2e штамма A/Duck/Potsdam1402-6/1986(M2ep) с копией M2e штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 (M2ek) между ними (BamHI-M2ep-PstI-M2ek-SalI-M2ep-KpnI). На первом этапе последовательность 5'-концевого M2ep вырезали из pQE30-3MP по сайтам BamHI и PstI и замещали ее синтетической последовательностью, кодирующей “человеческий” M2e. Затем по сайтам SalI и KpnI вырезали 3'-концевую копию M2ep и заменяли ее синтетической последовательностью, кодирующей M2e вируса “свиного” гриппа. В результате был получен вектор pQE30_3M(h + k + s).

На следующем этапе последовательность гена флагеллина была получена в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров FlgBH_F (AT GGA TCC GCA CAA GTA ATC AAC ACT AAC AGT CTG T) и FlgBH_R (AT GGA TCC ACG TAA CAG AGA CAG CAC GTT CTG C) и геномной ДНК *Salmonella typhimurium* в качестве матрицы. ПЦР фрагмент клонировали в векторе pQE30_3M(h + k + s) по сайту BamHI, отбирая клоны с «прямой» ориентацией вставки. Полученный экспрессионный вектор pQE30-flg-3M использовали в дальнейшей работе. Отсутствие обусловленных ПЦР мутаций в клонированном фрагменте было подтверждено с помощью секвенирования.

Для получения штамма-продуцента рекомбинантного белка Flg-3M плазмиду pQE30-flg-3M вводили в клетки *Escherichia coli* штамма DLT1270 с помощью трансформации. Штамм DLT1270, являющийся производным штамма DH10B, содержит ген репрессора лактозного оперона lacI, интегрированный в хромосому.

Очистку белка Flg-3М, содержащего N-концевой полигистидиновый таг, проводили методом металл-аффинной хроматографии. После элюции с Ni-NTA смолы (Promega) препарат рекомбинантного белка диализовали против 20 мМ фосфатно-солевого буфера рН 8,0, содержащего 145 мМ раствор NaCl. В результате был получен препарат белка Flg-3М с чистотой более 95% (рис. 1).

Конструирование экспрессионного вектора pQE30-flgP, выделение и очистка комплекса рекомбинантных белков 3MP + HBc + FlgP. Последовательность гена, кодирующего флагеллин с присоединенным к нему аптомерным пептидом GSLLGRMKGA, обеспечивающим связывание с HBc частицами [4] была получена в результате ПЦП с использованием праймеров FlgBH_F (AT GGA TCC GCA CAA GTA ATC AAC ACT AAC AGT CTG T) и FlgA_Sal (AT GTC GAC TTA CGC GCC TTT CAT ACG GCC CAG CAG GCT GCC ACG TAA CAG AGA CAG CAC GTT) с использованием ДНК pQE30-flg-3М в качестве матрицы. Полученный ПЦП-фрагмент обрабатывали BamHI и SalI и клонировали в экспрессионном векторе pQE30, обработанном теми же ферментами. Полученный экспрессионный вектор pQE30-flgP использовали в дальнейшей работе. Рекомбинантный белок FlgP экспрессировали в штамме DLT1270 и очищали методом металл-аффинной хроматографии. Белковый комплекс 3MP + HBc + FlgP получали смешиванием препарата 3MP-HBc и очищенного FlgP [4].

Синтетические пептиды M2e. В работе использовали синтетические пептиды G11, G26, G37 (НПО Верта, Санкт-Петербург), аминокислотная последовательность которых соответствовала M2e штаммов, A/Kurgan/05/2005(H5N1) – SLLTEVETP-TRNEWECRCSDDSSD, A(H1N1)pdm09–SLLTEVETP-TRNEWECRCSDDSSD и консенсусной последовательности вирусов гриппа А человека – SLLTEVE-TPIRNEWGCRCNDSSD.

Животные. Были использованы мыши линии Balb/c (самки) в возрасте 7–8 нед (массой 16–18 г), полученные из питомника «Столбовая» ГУ Научный центр биомедицинских технологий РАМН. Животных содержали в виварии НИИ гриппа в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (1977).

Иммунизация. Мышей иммунизировали троекратно с интервалом в 2 нед внутримышечно одним из рекомбинантных белков в дозе 50 мкг/мышь. Контрольной группе вводили PBS (фосфатный буферный раствор рН 7,2). Образцы крови, бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) забирали у 5 мышей каждой группы через 2 нед после третьей иммунизации и исследовали индивидуально.

Определение сывороточных антител к синтетическим пептидам M2e в иммуноферментном анализе. Иммуноферментный анализ проводили общепринятым методом [13]. Использовали 96-луночные планшеты для иммуноферментного анализа с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия). Синтетические пептиды M2e G-26, G-37, G-11 сорбировали в концентрации 5 мкг/мл (в фосфатном буфере рН 7,2–7,4). В качестве конъюгатов использовали моноклональные крысиные антимышинные IgG (Invitrogen, USA) в разведении 1:1000, меченные пероксидазой хрена, моноклональные крысиные биотинилирован-

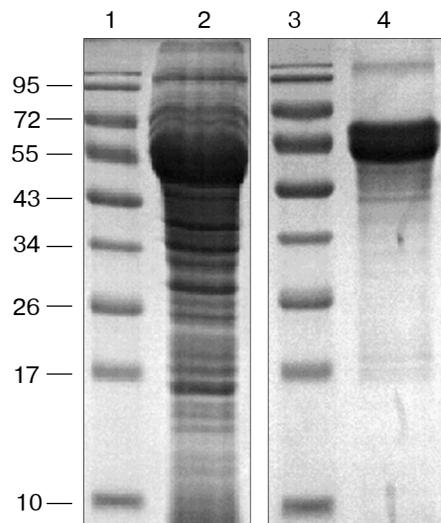


Рис. 1. Экспрессия и очистка рекомбинантного белка Flg-3М
1 и 3 – маркер молекулярной массы (кДа); 2 – белковый препарат, выделенный из штамма-продукта после индукции; 4 – очищенный белок Flg-3М.

ные антимышинные IgG1, IgG2a в разведении 1:500 (BD Bioscience, USA) и стрептавидинпероксидазу в разведении 1:1000 (BD Biosciences, USA). В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин (BD Bioscience, USA). Учет реакции проводили при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность по крайней мере в 2 раза больше, чем сыворотка неиммунизированных мышей в том же разведении.

Выделение вируса из легких. Через 2 нед после третьей иммунизации мышей заражали вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1). Вирус вводили интраназально в дозе 1 LD₅₀ (доза, вызывающая гибель 50% контрольных животных) в объеме 50 мкл/мышь под легким эфирным наркозом. Репродукцию вируса в легких мышей определяли по инфекционному титру путем титрования 10% суспензии легких мышей, полученной на 6-е сутки после заражения, на культуре клеток MDCK. Зараженные клетки инкубировали в течение 72 ч при 36°С в CO₂-инкубаторе. Уровень репродукции вируса оценивали по тканевому цитопатическому действию (в Ig ТЦД/50) в реакции гемагглютинации эритроцитов. Инфекционную активность вируса считывали по методу Рида и Менча.

Статистическая обработка данных. Значимость различий титров M2e в сыворотках, БАЛ и инфекционной активности вируса в легких оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Сконструированы 2 рекомбинантных препарата на основе флагеллина (генетически слитый белок Flg-3М) и комплекс белков, полученный в результате сборки *in vitro* 3MP+HBc+FlgP.

Внутримышечная иммунизация рекомбинантными белками стимулировала прирост анти-M2e специфических IgG; при этом титры антител к пептидам G-11, G-26, G-37 были практически одинаковыми (рис. 2 а). Уровень продукции анти-M2e IgG после иммунизации генетически слитым белком 3M2eFlg был в среднем в 7,5 раз выше, чем после иммунизации комплек-

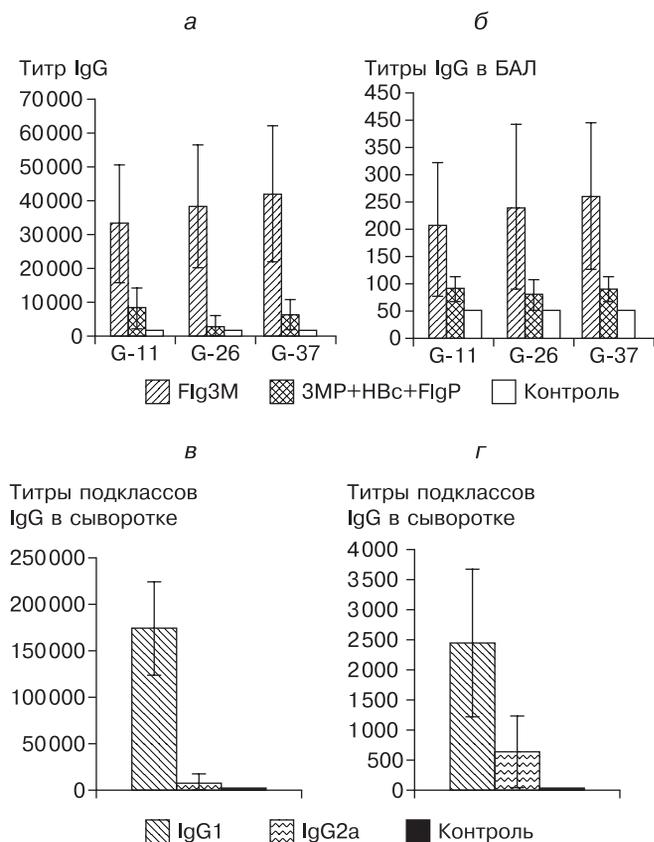


Рис. 2. Титры анти-M2e IgG в сыворотке крови (а), БАЛ (б), подклассов IgG (IgG1, IgG2a) (в, г) к синтетическим пептидам G-11-1 (M2e H5N1), G-26 (M2e H1N1pdm), G-37 (M2e консенсусный) у мышей после третьей иммунизации рекомбинантными белками Flg-3M, 3MP + HBc + FlgP.

а – различия титров IgG в опытных и контрольной группах достоверны ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно), в опытных группах достоверны ($p < 0,05$); б – различия титров IgG в опытных и контрольной группах достоверны ($p < 0,01$), достоверных различий в опытных группах нет ($p > 0,05$); в – анти-M2e (G-11-1) IgG1 и IgG2a после третьей иммунизации Flg-3M; г – анти-M2e (G-11-1) IgG1 и IgG2a после третьей иммунизации 3MP + HBc + FlgP.

сом белков 3MP + HBc + FlgP. Ранее было показано, что ковалентная сшивка флагеллина с целевым антигеном является определяющим фактором для иммуногенности препарата [12]. Уровень анти-M2e IgG в БАЛ (рис. 2 б) был также в 2,5 раза выше у мышей, иммунизированных Flg-3M, по сравнению с мышами, иммунизированными белковым комплексом 3MP + HBc + FlgP.

Иммунизация генетически слитым белком может стимулировать антигенспецифический, как В- так и Т-клеточный, иммунный ответ с образованием антигенспецифических антител семейства IgG1 и IgG2a [12]. Защита от летальной гриппозной инфекции у мышей, иммунизированных рекомбинантными белками с M2e, коррелирует с высокими уровнями IgG2a [9, 10, 15]. Это объясняется способностью IgG2a связываться с тремя Fc рецепторами (FcγRI, FcγRIII, FcγRIV) [15] и эффективно участвовать в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности – основном механизме анти-M2e-иммунитета [14]. IgG1 менее эффективны в элиминации вируса через антитело-зависимую клеточную цитотоксичность. Отношение подклассов IgG1/IgG2a в нашем исследовании при иммунизации 3M2eFlg составляло в среднем 24,5

Выделение вируса из легких мышей на 6-е сутки после заражения летальной дозой вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1)

Иммунизация	Доза заражения вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1)	Репродукция вируса в легких, Ig ТЦД/50
3MP + HBc + FlgP (50 мкг внутримышечно)	1LD/50	1,25 ± 0,0*
Flg-3M (50 мкг внутримышечно)	1LD/50	1,25 ± 0,4*
Контроль	1LD/50	2,10 ± 0,3

Примечание. * – достоверное ($p < 0,01$) различие между опытными и контрольной группами.

(рис. 2 в), что свидетельствует о формировании иммунного ответа по Th2-типу с преимущественной продукцией интерлейкина 4. Иммунизация 3MP + HBc + FlgP стимулировала более сбалансированный Th1/Th2-ответ. Отношение IgG1/IgG2a в сыворотке составило 3,8 (рис. 2 г). Таким образом, очевидно влияние белкового носителя на синтез подклассов анти-M2e-IgG. Выявлено, что репродукция вируса в легких мышей, иммунизированных обоими белками, была достоверно ниже, чем у контрольных мышей (см. таблицу), что свидетельствует об ограничении вирусной репликации в легких и снижении тяжести инфекции.

Полученные данные свидетельствуют о потенциальной эффективности исследуемых рекомбинантных белков против вирусов гриппа А различных субтипов. Следует отметить, что внутримышечный путь иммунизации рекомбинантных белков на основе флагеллина не является оптимальным, так как известно, что на дендритных клетках слизистых оболочек экспрессия TLR5 значительно выше, чем на дендритных клетках селезенки [8], т. е. предпочтительным путем вакцинации является мукозальный и интраназальный. Иммунизация Flg-3M, будет более эффективной за счет как повышения иммуногенности препарата, так и формирования местного иммунитета. Тем не менее, в нашей работе показана возможность получения одинаковой иммуногенностью как против вирусов гриппа А человека, так и против высокопатогенных вирусов гриппа птиц.

Авторы выражают благодарность заместителю директора Центра «Биоинженерия» РАН, заведующему лабораторией систем молекулярного клонирования, доктору биологических наук Н.В. Равину за помощь в подготовке статьи.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 8292.

ЛИТЕРАТУРА

1. Котляров Р.Ю., Куприянов В.В., Мигунов А.И. и др. Разработка рекомбинантной вакцины против гриппа А(H1N1) 2009 на основе вирусоподобных наночастиц – носителей внеклеточного домена M2 белка. Acta Naturae. 2010; 2 (2): 75–80.
2. Равин Н.В., Котляров Р.Ю., Марданова Е.С. и др. Продукция в растениях рекомбинантной противогриппозной вакцины на основе вирусоподобных HBc-частиц, несущих внеклеточный домен M2 белка. Биохимия. 2012; 77 (1): 43–52.
3. Цыбалова Л.М., Киселев О.И. Универсальные вакцины против гриппа. Разработки, перспективы использования. Вопросы вирусологии. 2012; 57 (1): 9–14.
4. Blokhina E., Kuprianov V., Stepanova L. et al. A molecular assembly system for presentation of antigens on the surface of HBc

- virus-like particles. *Virology*. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.014>
5. Du L., Zhou Y., Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines. *Microb. Infect.* 2010; 12: 280–6.
 6. Iwasaki A., Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune response. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 987–95.
 7. Fan J., Liang X., Horton M.S. et al. Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine*. 2004; 22: 2993–3003.
 8. Feng T., Cong Y., Alexander K., Elson C.O. Regularion of toll-like receptor 5 gene expression and function on mucosal dendritic cells. *PLoS One*. 2012; 7: e35918.
 9. Filette M., Fiers W., Martens W. et al. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine*. 2006; 24: 6597–601.
 10. Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K. et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*. 2009; 27: 6280–3.
 11. Honko A.N., Sriranganathan N., Lees C.J. et al. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect. immun.* 2006; 74: 1113–20.
 12. Huleatt J.W., Jacobs A.R., Tang J. et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine*. 2007; 25: 763–75.
 13. Huleatt J.W., Nakaar V., Desai P. et al. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*. 2008; 26: 201–14.
 14. Jegerlehner A., Schmitz N., Storni T. et al. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J. Immunol.* 2004; 172: 5598–605.
 15. Mozdzanowska K., Feng J.Q., Eid M. et al. Induction of influenza type A virus specific resistance by immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2. *Vaccine*. 2003; 21: 2616–26.
 16. Osterhaus A., Fouchier R., Rimmelzwaan G. Towards universal influenza vaccines? *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2011; 366: 2766–73.
 17. Rudolph W., Ben-Yedidia T. Human vaccines: policy. *Hum. Vaccines*. 2011; 7: 10–1.
 18. Pumpens P., Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*. 2001; 44: 98–114.
 19. Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., Saelens X. Universal M2 ectodomen-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert. Rev. Vaccines*. 2009; 8: 499–508.
 20. Talbot H.K., Rock M.T., Johnson C. et al. Immunopotential of trivalent influenza vaccine when given with VAX102, a recombinant influenza M2e vaccine fused to the TLR5 ligand flagellin. *PLoS One*. 2010; 5: e14442.

Поступила 15.01.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013
УДК 578.832.1:578.242].083.2

А. А. Азаренок, Е. М. Еропкина, А. Р. Прочуханова, А. А. Шалдзян, Н. М. Козлова, К. Н. Козелецкая, И. Н. Жилинская

Воздействие вирусов гриппа А и их поверхностных белков на метаболизм клеток эндотелия кровеносных сосудов человека

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург

Современные эпидемические штаммы вирусов гриппа подтипов H5N1, H3N2, H1N1 способны снижать метаболизм клеток эндотелия в пределах от 20 до 60% (по сравнению с контролем). Степень снижения активности дегидрогеназ зависела от дозы заражения клеток вирусом и от времени его репродукции. Гемагглютинин и нейраминидаза также активно снижали метаболизм клеток в пределах от 5 до 60%, что зависело от концентрации белков и времени их воздействия на клетку. По МТТ-тесту нейраминидаза оказалась активнее гемагглютинина (при концентрации белков 50 мкг/мл).

Ключевые слова: вирус гриппа, белки, клетки эндотелия, метаболизм, активность дегидрогеназ

The Influenza Viruses and Their Surface Proteins Impact on the Metabolism of Human Blood Vessel Endothelium Cells

A. A. Azarenok, E. M. Eroпкиna, A. R. Prochukhanova, A. A. Shaldzhyan, N. M. Kozlova, K. N. Kozeletskaya, I. N. Zhilinskaya

Federal State Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

The modern influenza virus subtypes H3N2, H5N1, and H1N1 reduced the metabolism of the endothelial cells within the range from 20% to 60% (compared with control). The degree of the activity of the dehydrogenase reduction depended on the dose of virus and time of virus reproduction. HA and NA also actively reduced the metabolism of the cells ranging from 5% to 60%, depending on the concentration of the proteins and time of their impact on cells. Neuraminidase was more active than hemagglutinin in the MTT test (at concentration 50 µg protein/ml).

Key words: influenza virus, proteins, endothelium cells, metabolism, activity of dehydrogenases

Общеизвестно, что поражение вирусом гриппа кровеносных сосудов, приводящее к тромбгеморрагическому синдрому, является одним из признаков тяжело протекающей гриппозной инфекции [8]. Однако этому аспекту патогенеза гриппа ранее уделялось недостаточ-

но внимания. За последнее десятилетие появился ряд данных, указывающих на взаимодействие вируса гриппа с эндотелием кровеносных сосудов, в частности на возможность репродукции вируса в клетках эндотелия с последующим развитием их дисфункции [2, 3, 11].

Контактная информация:

Жилинская Ирина Николаевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр., ст. науч. сотр.; e-mail: irina@influenza.spb.ru