

новской области в 2010 году». – Ульяновск, 2011. – 154 с.

15. Информационный бюллетень о состоянии поверхностных водных объектов, водохозяйственных систем и сооружений на территории Ульяновской области за 2008 год. – Ульяновск: Федеральное агентство водных ресурсов, 2009. – 65 с.

16. Русинек О.Т. Паразиты рыб озера Байкал (фауна, сообщества, зоогеография, история формирования). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. – 571 с.

17. Linzey D., Burroughs J., Hudson L., Marini M., Robertson J., Bacon J., Nagarkatti M., Nagarkatti P. Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. // *Int. J. Environ. Health. Res.* – 2003. – V.13(2). – P.125-48.

18. Sures B., Taraschewski H., Jackwerth E. Lead accumulation in *Pomphorhynchus laevis* and its host. // *J. Parasitol.* – 1994. – V.80(3). – P.355-357.

19. Sures B., Taraschewski H., Siddall R. Heavy metal concentrations in adult acanthocephalans and cestodes compared to their fish hosts and to established free-living bioindicators. // *Parassitologia.* – 1997. – V.39(3). – P.213-218.

20. Thielen F., Zimmermann S., Baska F., Taraschewski H., Sures B. The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel as a bioindicator for metal pollution in the Danube River near Budapest, Hungary. // *Environ Pollut.* – 2004. – V.129(3). – P.421-429.

21. Scheef G., Sures B., Taraschewski H. Cadmium accumulation in *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) from experimentally infected rats. // *Parasitol. Res.* – 2000. – V.86(8). – P.688-691.

22. Torres J., Peig J., Eira C., Borrás M. Cadmium and lead concentrations in *Skrjabinotaenia lobata* (Cestoda: Catenotaeniidae) and in its host, *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) in the urban dumping site of Garraf (Spain). // *Environ. Pollut.* – 2006. – V.143(1). – P.4-8.

23. Jankovská I., Vadlejch J., Száková J., Miholová D., Kunc P., Knížková I., Langrová I. Experimental studies on the lead accumulation in the cestode *Moniezia expansa* (Cestoda: Anoplocephalidae) and its final host (*Ovis aries*). // *Ecotoxicology.* – 2010. – V.19(5). – P.928-932.

24. Sures B., Grube K., Taraschewski H. Experimental studies on the lead accumulation in the cestode *Hymenolepis diminuta* and its final host, *Rattus norvegicus*. // *Ecotoxicology.* – 2002. – V.11(5). – P.365-368.

УДК: 619:615.317:616.98:578

ДНК-ВАКЦИНЫ: КОНСТРУИРОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ (ОБЗОР)

Капустина Ольга Владимировна, кандидат ветеринарных наук;

Власова Наталья Никифоровна, доктор биологических наук;

Южук Татьяна Эммануиловна, кандидат биологических наук;

Хухорова Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук;

Бальшева Вера Ивановна, доктор биологических наук

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии

Российской академии сельскохозяйственных наук

601120, Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров

Тел./факс: +7(49243)62125, www.vniivvm.ru

Ключевые слова: лихорадка долины Рифт, ДНК-вакцины, протективный иммунитет.

Статья посвящена проблемам создания эффективных защитных иммунопрепаратов

нового поколения против лихорадки долины Рифт. Представлен анализ результатов исследований в области конструирования как традиционных, так и генно-инженерных вакцин. Показана перспектива использования ДНК-вакцин для защиты от особо опасных инфекций человека и животных.

Более 70 процентов всех известных в мире болезней животных и человека имеют инфекционную природу. Завоз ряда существующих так называемых арбовирусных инфекций способен, благодаря наличию сходных климатических условий и наличию потенциальных переносчиков возбудителя, вызвать их распространение в районах, благополучных по этим болезням. К такому роду инфекций относится лихорадка долины Рифт (ЛДР), возбудителем которой является вирус семейства Bunyaviridae, рода Phlebovirus.

Лихорадка долины Рифт – особо опасная зооантропонозная болезнь, относящаяся ко 2-ой группе патогенности для человека и числу нозоодиниц, имеющих тенденцию к расширению своего нозоареала [1]. Вспышки ЛДР сопровождаются внезапно возникающими массовыми абортами среди беременных животных и гибелью молодняка овец и крупного рогатого скота, достигающей 90-100%.

До 50 годов 20 века циркуляция вируса ЛДР не фиксировалась. С конца 50 годов прошлого столетия и по настоящее время эпизоотии/эпидемии ЛДР, ранее ограничивавшиеся субсахарской областью Африки, распространились на севере (Египет, 1977-79гг), западе (Мавритания, 1987г) и практически на всей территории африканского континента и за его пределами – остров Мадагаскар, 1991г., Аравийский полуостров, 2000-2001гг. Периодически отмечаются отдельные случаи выделения вируса ЛДР или специфических антител в различных точках Евразии - Турции (1987г.), Афганистане, Португалии, Германии (2010г.) [2].

Современное развитие экономических, культурных и транспортных связей России со странами, неблагополучными по ЛДР, а также наличие приграничных территорий с соответствующими климатическими условиями не исключают возможность заноса возбудителя ЛДР в нашу страну.

Учитывая высокую опасность болезни, необходимо разработать эффективные защитные препараты для человека и животных [3].

Вакцинация является надежным и эффективным средством контроля инфекционных болезней, универсальным практически в любых условиях – от современного животноводства на промышленной основе до примитивного частного хозяйства.

Контроль ЛДР в эндемичных районах достигается ежегодной вакцинацией поголовья скота. Для этого широко используются живые и инактивированные ветеринарные вакцины. Используемая живая вакцина из аттенуированного штамма наряду с протективными свойствами обладает абортгенностью и тератогенностью [4]. Инактивированные вакцины более безопасны при применении, особенно для беременных животных и молодняка. Однако для создания стойкого длительного иммунитета требуется многократное введение вакцины и регулярная ревакцинация, что приводит к неудобству и удорожанию процедуры вакцинации. К тому же при изготовлении вакцины используют вирулентные штаммы вируса ЛДР. Что небезопасно в плане производства и не рекомендуется для зон не эндемичных по ЛДР.

На современном этапе развития в области иммунологии и биотехнологии стала очевидной необходимость создания принципиально новых подходов к конструированию вакцин на основе знаний молекулярной биологии и изучения антигенной структуры патогена, иммунного ответа организма на патоген и его компоненты.

С начала 90-х годов прошлого века научные лаборатории за рубежом начали активно работать в направлении создания субъединичных, рекомбинантных и ДНК-вакцин против ЛДР.

Для создания вакцин против ЛДР потенциально перспективными являются

структурные вирусные гликопротеины, используемые в качестве антигенов, индукторов антительного ответа, обычно коррелирующего с протективной активностью препарата.

Впервые изучение экспрессии белков вируса ЛДР в эукариотической системе было проведено 1986 году Keegan K. и Collett M.S. Авторами был секвенирован полученный в *E.coli* гликопротеин G2, определены его аминокислотная последовательность и сайты гликозилирования [5]. Dalrymple J.M. и др. [6]. При проведении картирования протективных детерминант на гликопротеинах G1 и G2 вируса ЛДР определили на поверхности гликопротеина G2 три нейтрализующих эпитопа. В дальнейшем рядом авторов была подтверждена индукция вируснейтрализующих антител (ВН) и возможность создания протективного иммунного ответа после введения животным экспрессированных структурных белков G1/G2 [7,8].

В качестве альтернативы инактивированным вакцинам против ЛДР были разработаны вакцины на основе нереплицирующихся вирусоподобных частиц (ВПЧ), состоящих из оболочечных гликопротеинов G1/G2 и белка нуклеокапсида вируса ЛДР. ВПЧ имеют преимущество перед отдельными протеинами с точки зрения их антигенной стабильности и иммуногенности [9]. Так, трехкратное введение 10^6 ВПЧ, в отличие от введения отдельных вирусных белков, обеспечивает 100%-ную защиту мышей от контрольного заражения вирулентным штаммом вируса и индуцирует синтез ВН антител в пределах 1:250-1:1250 [10, 11, 12].

При использовании эукариотической векторной системы на основе вируса осповакцины Kakach L.T., Wasmoen T.L. с соавторами удалось экспрессировать рекомбинантные белки, кодируемые М-сегментом генома вируса ЛДР, обладающие протективными свойствами [13]. Аналогичные результаты были получены Schmaljohn C.S., Parker M.D. и соавторами при экспрессии этих белков в бакуловирусной системе [14], что позволило перейти к разработке рекомбинантных и ДНК-вакцин [15].

На следующем этапе развития реком-

бинантных технологий для разработки защитных иммунопрепаратов против ЛДР Gorchakov R., Volkova и др. [16] изучили формирование протективного иммунитета против ЛДР и показали, что после введения Венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ)-репликона, Синдбис-репликона, экспрессирующих G1, G2, и NSm уровень ВН антител у мышей и овец был не ниже, чем 1:80, и животные были устойчивы против контрольного заражения. Holman D.H., Penn-Nicholson A и др. показали, что применение для вакцинации аденовирусного вектора со встройкой гена гликопротеина, Heise M.T., Whitmore A. и др. - альфавирусного репликона, экспрессирующего гликопротеин G2 индуцировало как синтез ВН антител в высоких титрах, так и клеточный иммунный ответ [17, 18].

С использованием методов обратной генетики Kortekaas J., Dekker A. и др. был получен рекомбинантный вирус, в качестве вектора использовали вирус болезни Ньюкасла. На экспериментальном поголовье КРС авторы изучили возможность использования полученной рекомбинантной конструкции в качестве вакцины, показав, что даже однократное внутримышечное введение препарата вызывало образование вируснейтрализующих антител к вирусу ЛДР и обеспечивало устойчивость животных к контрольному заражению [19].

Эти исследования доказали, что вирусные векторы пригодны для экспрессии вирусных белков ЛДР и могут в дальнейшем использоваться для конструирования ветеринарных вакцин.

Очередной этап развития вакцинологии начался с появлением положительных результатов при ДНК-вакцинации. Иммунизация плазмидой, с генами, кодирующими вирусный/или вирусные протеины является иным механизмом стимуляции иммунного ответа.

Особенность ДНК-иммунизации состоит в ее эффективности, даже в присутствии материнских антител, к тому же, используя один и тот же вектор, можно конструировать вакцины на основе фрагментов ДНК различных штаммов возбудителей в качестве по-

ливалентных защитных препаратов [20].

Доставка плазмидной ДНК со встроенными репортерными генами осуществляется путем парентеральной, интраназальной или внутрикожной инокуляции. Этот подход обладает преимуществом, состоящим в нацеливании ДНК на широкий ряд антиген-презентирующих клеток. Однако в индукции иммунного ответа эффективно участвует лишь 0,1-0,2% плазмидной ДНК, а большая ее часть быстро разрушается. Поэтому для иммунизации животных требуется значительное количество нуклеиновой кислоты. Так, например, для индукции иммунного ответа на мышью требуется не менее 50 мкг плазмидной ДНК [21].

Наиболее перспективным приемом, позволяющим расширить возможности ДНК-вакцинации, является включение ДНК в липосомы или биodeградируемые микросферы, которые обеспечивают защиту ДНК и позволяют проводить сочетанную инъекцию плазмидной ДНК и генетических адъювантов, многократно усиливая иммунный ответ [22,23].

Несмотря на быстрые темпы развития этого направления, остается недостаточно изученным широкий круг вопросов, касающихся вероятности хромосомной интеграции и механизмов индукции иммунного ответа при ДНК-вакцинации [21].

Иммунный ответ на ДНК-вакцины можно улучшить путем одновременного введения обычных адъювантов, иммуностимуляторов, таких как последовательности структуры CpG, плазмид, экспрессирующих цитокины, костимуляторные молекулы.

Поэтому при конструировании ДНК-вакцин с целью повышения их иммуногенности подбирают соответствующие адъюванты и оценивают эффективность их применения [24].

Wei Sheng и Wu Xue Bao в 2007 г. установили, что введение плазмид с генами, кодирующими основные гликопротеины вируса ЛДР - GN, GC и G(N+C) - мышам линии BALB/c, позволяет получить высокоэффективный иммунный ответ [25].

Продолжение исследований по созданию ДНК-вакцин против лихорадки долины

Рифт было осуществлено Lorenzo G., Martin R. с соавторами [26]. Исследователи показали, что праймирование с использованием плазмид, кодирующих нуклеопротеин и гликопротеин вируса ЛДР, повышает эффективность иммунизации аттенуированными вакцинами, одновременно сводя к минимуму возможные осложнения от использования живой вакцины. В 2010 г. Boshra H., Lorenzo G. и соавторы предложили схему ДНК-иммунизации трансгенных мышей линии IFNAR(-/-) плазмидной конструкцией, кодирующей нуклеопротеин. Титр вирусспецифических антител и Т-клеточный ответ у этих животных имел более высокий уровень, чем при иммунизации по той же схеме плазмидой, кодирующей гликопротеина. [27].

Последующие работы Lagerqvist N., Naslund J. и соавторов подтвердили эффективность иммунизации мышей с помощью плазмид, кодирующих гены белков вируса ЛДР. Ими было установлено, что вируснейтрализующие антитела образуются только при сочетанной иммунизации животных плазмидами, несущими гены нуклеопротеина и гликопротеина вируса ЛДР [28].

Прайм-бустерный режим вакцинации индуцирует синтез специфических антител и пролиферацию лимфоцитов, обеспечивая устойчивость животных к заражению вирулентным вирусом. Дальнейшая корректировка этой стратегии может привести к полной их защите против ЛДР. Безопасность разрабатываемых вакцин против ЛДР является важным моментом. ДНК-вакцины не реплицирующиеся в организме имеют повышенный уровень безопасности.

Таким образом, исследования, направленные на разработку и конструирование экологически безопасных и эффективных вакцинных препаратов, в том числе ДНК-вакцин, использование адъювантов нового поколения для потенцирования иммуногенности генно-инженерных продуктов, внедрение их в ветеринарную практику являются приоритетными и для России. ДНК-вакцины могут составить серьезную конкуренцию традиционным вакцинам, особенно в борьбе с особо опасными болезнями животных, когда инактивированные

вакцины не всегда обеспечивают напряженный иммунитет, а живые вакцины из аттенуированных штаммов могут представлять опасность в связи с возможностью реверсии патогенности и реассортации с циркулирующими полевыми вирусами. Также является целесообразным заранее подготовить плазмиды, экспрессирующие гены протективных белков возбудителей особо опасных инфекционных болезней животных.

Библиографический список

1. DiGiovanni, C.J., Community reaction to bioterrorism: prospective study of simulated outbreak / C.J. DiGiovanni, B. Reynolds, R. Harwell, E.B. Stonecipher, F.M.Jr.Burkle //Emerg Infect Dis.-2003.- Jun.-Vol 9.-№6.-P.708-712.
2. Balkhy, H.H. Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian peninsula/ H.H.Balkhy, Z.A.Memish//Int J Antimicrob Agents.-2003.-Vol 21.-№2.-P.153-157.
3. Хухорова, И.Ю. Новые методы диагностики и специфичной профилактики Лихорадки долины Рифт / И.Ю. Хухорова, О.В. Капустина, А.С. Каталымов//Матер.междунар. конф. г. Харьков.-2007.-С. 365-368.
4. Ikegami T, Makino S. Rift valley fever vaccines/T. Ikegami,S.Makino//Vaccine.-2009/- Nov 5.-№27.- Suppl 4:D.-P.69-72.
5. Keegan K., Cjlett M.S. Use of bacterial expressioncloning to define amino acid sequences of antigenic determinants on the G2 glycoprotein of Rift Valley fever virus//J.Virol.-1986/58.-May 2.-P.263-270.
6. Dalrymple J.MacM.S. Mapping protective determinants of Rift Valley fever using recombinant vaccinia virus. //In:Lerner R. A., Ginsberg H., Chanock R.M., Brown F. editors. Vaccines 89 Modern Approaches to New Vaccines including Puvention of AIDS. Cold Spring Harbor Laboratory, New York:1989/P.371-375.
7. Suzich J.A., Kakach I.T., Collett M.S. Expression strategy of a flebovirus: biogenesis of proteins from the Rift Valley fever M segment//J. Virol.- 1990.-64(4).-P. 1549-1555/
8. Wallace D.B. Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regiment to Rift Valley fever/Ellis C.E., Espach A., Smith S.J., Greyling R. K.//Vaccine.-2006.-24.-P.7181-7189.
9. Mandell R.B. Chimeric virus-like particle protect mict and rat against letal challenge/ Koukuntla R.,Magler L.J.K., Carzoli A.K., Freinberg A.N.//Virol.-2010.-5.- 397(1).-P.187-215.
10. Noad R., Roy P. Virus-like particle as immunogenes//Trends microbial.-2003.-11 (9).-P.438-444..
11. Naslund, J. Vaccination with virus-like particles protects mice from lethal infection of Rift Valley Fever Virus/J.Naslund, N.Lagerqvist, M.Habjan, A.Lundkvist, M.Evander, C.Ahlm, F.Weber, G.Bucht//Virology.-2009.-Mar 15.-Vol 385.-№2.-P.409-415. Epub 2009 Jan 20
12. de Boer, S.M. Rift Valley fever virus subunit vaccines confer complete protection against a lethal virus challenge/S.M. Dt Boer, J.Kortekaas, A.F.Antonis, J.Kant, J.L.van Oploo, P.J.Rottier, R.J.Moormann// Vaccine.-2010.-Mar 8.-Vol 28.-№11.-P.2330-2339.
13. Kakach, L.T. Rift Valley fever virus M segment: phlebovirus expression strategy and protein glycosylation/L.T.Kakach, J.A.Suzich, M.S.Collett //Virology.- 1989.- Vol 170.-№2.- P.505-510.
14. Schmaljohn, C.S. Baculovirus expression of the M genome segment of Rift Valley fever virus and examination of antigenic and immunogenic properties of the expressed proteins/ C.S. Schmaljohn, M.D.Parker, W.H.Ennis, J.M.Dalrymple, M.S.Collett, J.A.Suzich, A.L.Schmaljohn//Virology.-1989.- Vol 170.-№1.-P.184-192.
15. Pepin M. Rift Valley fever virus: an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention/M/ Pepin, M.Bouloy, B.H. Bird, A. Kemp, J. Paveska//Vet. Res.-2010/-41.- P.61-101.
16. Gorchakov R. Comparative analisis of the alfavirus-based vectors expressing Rift Valley fever virus glicoproteins/ R. Gorchakov, E. Volkova, N. Yun, O. Petrakova, N. Sethzinde // Virology.-2007.-366.-P.212-225.
17. Holman, D.H. A complex adenovirus-vectored vaccine against Rift Valley fever virus protects mice against lethal infection in the presence of preexisting vector immunity /D.H. Holman, A. Penn-Nicholson, D.Wang, J.Woratanadham, M.K.Harr, M.Luo, E.M.Maher, M.R.Holbrook, J.Y.Dong //Clin Vaccine Immunol.- 2009.- Vol 16.-№11.-P.1624-

1632.

18. Heise M. T. An alphavirus replicon-derived candidate vaccine against Rift Valley fever virus/ M. T. Heise, A. Whitmore, J. Thompson, M. Parsons, A.A. Grobbelaar, A. Kemp // *Epidemiol. Infect.*- 2009.-137.-P.1309-1318.

19. Kortekaas, J. Intramuscular inoculation of calves with an experimental Newcastle disease virus-based vector vaccine elicits neutralizing antibodies against Rift Valley fever virus / J. Kortekaas, A.Dekker, S.M.de Boer, K.Weerdmeester, R.P.Vloet, A.A.de Wit, B.P. Peeters, R.J.Moormann//*Vaccine.*-2010.- Mar 8.-Vol 28.-№11.-P.2271-2276.

20. Spik K. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hanta virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus/ K.Spik, A. Shurtleff, A.C. McElroy, M.C. Guttieri, J.W. Hooper, C.S. Schmaljohn// *Vaccine.*-2006.-24.-P.4657-4666.

21. Орлянкин // *Вестник РАСХН.*-1998.-5.-С.74-76.

22. Балышева, В.И. Биодegradуемые микрокапсулы с включенными в них антигенами для создания новых ДНК-вакцин / В.И. Балышева, О.Е.Селина, С.Ю. Белов, Н.Н.Власова, Ф.И.Чурин, А. Бартковиак, Г.Б.Сухоруков, Е.А.Марквичева// *Биоорганическая химия.*- 2009.-Т.35.- № 1.- С.113-121.

23. Balysheva, V.I. Effect of microcapsule composition upon specific antibody induction/ V.I. Balysheva, N.N.Vlasova, E.A.Markvicheva,

S.Yu. Belov, O.V. Kapoustina, O.Ye.Selina // *XY International Workshop on bioencapsulation*, Dublin, Ireland.-2008.- 4-6 September.-P45.-P.1-4.

24. Mkrtichyan M. Immunostimulant adjuvant patch enhances humoral and cellular immune responses to DNA immunization/ M. Mkrtichyan, A. Ghochikyan, N. Movsesyan, A. Karapetyan, G. Begoyan//*DNA Cell Biol.*-2008.-27.-P.19-24.

25. Wei Sheng, Wu Xue Bao Study on DNA immune of envelope protein gene of Rift Valley fever virus// *Virology.*-2007.- 47(4).-P.677-681.

26. Lorenzo, G. Priming with DNA plasmids encoding the nucleocapsid protein and glycoprotein precursors from Rift Valley fever virus accelerates the immune responses induced by an attenuated vaccine in sheep /G. Lorenzo, R.Martin-Folgar, F.Rodriguez, A.Brun// *Vaccine.* -2008.-Sep26.-Vol 26.-№41.-P.5255-5262.

27. Boshra H., Lorenzo, G.,Rodrigez F., Brun A. A DANN vaccine encoding ubiquitinated Rift Valley fever virus nucleoprotein provides consistent immunity and protects IFNAP (-/-) mice upon lethal virus challenge//*Vaccine.*- 2011.-29 (27).-P. 4469-4475.

28. Lagerqvist, N. Characterisation of immune responses and protective efficacy in mice after immunisation with Rift Valley Fever virus cDNA constructs/N.Lagerqvist, J.Naslund, A.Lundkvist, M.Bouloy, C.Ahlm, G.Bucht // *Virology Journal.*-2009.- Vol 6.-P.6 -10.

УДК 612.753:619

РОЛЬ ПРЕПАРАТОВ ВИТАМИНА А И БЕТА-КАРОТИНА В РЕГУЛЯЦИИ БИОМЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОСТЕЙ СКЕЛЕТА ПОРОСЯТ

Любина Екатерина Николаевна, кандидат биологической наук, доцент кафедры «Биология, химия, технология хранения и переработки продуктов растениеводства» ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия» 432063, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1
Тел. 8(8422)559516; e-mail:star982@rambler.ru

Ключевые слова: свиньи, витамин А, бета-каротин, предельная прочность кости на излом, момент инерции

В статье описано влияние скармливания новых добавок витамина А и каротиноидов