

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* И ОЦЕНКА ЕГО ВЛИЯНИЯ НА СПЕРМАТОЗОИДЫ ЧЕЛОВЕКА

М.В. Плосконос

д.б.н., доцент, кафедра химии, Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России
E-mail: ploskonoz@mail.ru

Предложен новый способ получения липополисахарида *Chlamydia trachomatis* (ЛПС), основанный на аффинной хроматографии на конканавалин-А-сефарозе. Исследовано влияние ЛПС (серовар E) в условиях *in vitro* на сперматозоиды фертильных мужчин. Выявлена способность ЛПС снижать подвижность гамет и индуцировать у них экстернализацию фосфатидилсерина, что является ранним признаком апоптоза. Показано, что ЛПС как один из факторов патогенности *C. trachomatis* оказывает цитотоксическое действие на сперматозоиды человека, снижая их фертильность.

Ключевые слова: *Chlamydia trachomatis*, липополисахариды, сперматозоиды, фертильность, апоптоз, фосфатидилсерин.

Для цитирования: Плосконос М.В. Получение липополисахарида *Chlamydia trachomatis* и оценка его влияния на сперматозоиды человека. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(11):51-56.
<https://doi.org/10.29296/25877313-2018-11-08>

Chlamydia trachomatis – один из наиболее распространённых возбудителей бактериальных инфекций, передаваемых половым путем. Хламидийная инфекция может являться причиной нарушения фертильности у мужчин и женщин и, как следствие, причиной бесплодных браков, представляющих серьёзную медико-социальную проблему [1, 2].

Механизм, вызывающий бесплодие, – острая воспалительная реакция, связанная с хламидийной инфекцией, приводящая к перманентному рубцеванию слизистых оболочек. У мужчин хламидийная инфекция вызывает эпидидимит и/или простатит, который может привести к стенозу капиллярной системы, орхиту или ухудшению функций дополнительных желёз [3]. Однако есть данные, что *C. trachomatis* непосредственно повреждает гаметы и таким образом приводит к бесплодию независимо от повреждений репродуктивного эпителия [4].

Если в отношении этиологической роли хламидий в развитии обструктивной формы бесплодия сомнений не возникает, то единого взгляда на изменение параметров эякулята не существует до сих пор. Невелико число исследований, посвящённых изучению влияния *C. trachomatis* на показатели спермограммы [5, 6].

Возможность того, что *C. trachomatis* непосредственно повреждает гаметы, возникает в результате особенного цикла развития хламидий. Бактерия существует как чередование между внеклеточной, но метаболически неактивной инфек-

ционной формой (элементарные тельца (ЭТ)) и внутриклеточной метаболически активной репродукционной формой (ретикулярные тельца), которая использует внутриклеточные механизмы клетки хозяина для воспроизводства. Следовательно, эпителий инфицированного индивидуума любого пола будет периодически выделять большие количества ЭТ, которые, в свою очередь, могут оказывать непосредственное влияние на гаметы в пределах репродуктивного тракта.

Хламидии – облигатные внутриклеточные паразиты, способные к длительной персистенции в организме хозяина. Однако до конца непонятны механизмы патогенного действия *C. trachomatis*, несмотря на то, что неизвестны способности хламидий к модуляции суицидной программы клеток хозяина – апоптоза [7]. На разных этапах своего жизненного цикла *C. trachomatis* реализует различную тактику: подавление апоптоза на начальном этапе для обеспечения внутриклеточного размножения и активация апоптоза на этапе выхода инфекционных ЭТ и дальнейшего распространения инфекции.

Апоптоз, как особый вид гибели клетки, является физиологическим процессом регулирования сперматогенеза. Апоптоз мужских гамет характеризуется определённым набором биохимических маркеров, увеличение экспрессии которых коррелирует с фертильностью [8].

Для процесса апоптоза сперматозоидов характерно сочетание морфологических и биохимиче-

ских признаков, среди которых – изменения в клеточной мембране, проявляющиеся в нарушении фосфолипидной асимметрии цитоплазматической мембраны и перемещение фосфолипида фосфатидилсерина (ФС) на её внешнюю сторону [9–11].

Апоптогенное воздействие *C. trachomatis* может реализоваться в результате действия факторов патогенности хламидий – отдельных структурных компонентов бактериальной клетки, либо секретлируемых молекул с конкретными звеньями сигнального пути, ведущего к апоптозу. Факторы патогенности *C. trachomatis*, к которым относятся липополисахариды (ЛПС) – мощные эндотоксины бактериальной клетки, могут оказывать цитотоксическое действие на половые клетки, угнетать их функции и вызывать гибель, играть роль в осуществлении апоптоза, влиять на физиологию репродуктивных процессов у мужчин, приводя к бесплодию [2].

Изучение апоптогенного действия ЛПС *C. trachomatis*, как структурных компонентов бактериальной клетки, а также обсуждение микробиологических аспектов патогенеза мужского бесплодия является весьма актуальным и важным в свете поиска новых подходов к лечению и профилактике хронических инфекций для разработки методических подходов по ранней диагностики и терапии бесплодия.

Для оценки влияния ЛПС *C. trachomatis* на сперматозоиды важен правильный выбор способа получения ЛПС, а также подбор условий, близких к физиологическим, для инкубации ЛПС со сперматозоидами *in vitro*.

Имеющиеся способы получения ЛПС довольно длительны и характеризуются невысоким выходом продукта из-за потери ЛПС на этапах ультрацентрифугирования или на многочисленных процедурах лиофильной сушки, приводящих к нарушению нативных свойств ЛПС и, в первую очередь, ухудшению растворимости продукта [12, 13].

При этом выделенный ЛПС имеет невысокую степень очистки от примесей других бактериальных компонентов (белков и нуклеиновых кислот), что ограничивает его дальнейшее использование, так как может привести к ошибочной оценке влияния эндотоксина на жизнеспособность гамет, ведь поверхностные белки внешней мембраны бактерий – порины, способны оказывать влияние на клетки. Кроме того, известные способы выделения ЛПС *C. trachomatis* являются достаточно «жесткими» в химическом плане: используемые

для выделения эндотоксина летучие, ядовитые органические растворители (ацетон, хлороформ, петролейный эфир) могут влиять на структуру ЛПС, что способно отразиться на его биологической активности, а также на жизнеспособность и морфофункциональные характеристики половых клеток при проведении инкубации гамет с ЛПС *in vitro*.

Недостатки известных способов выделения ЛПС из бактериальных клеток стали причиной для поиска нового способа получения ЛПС *C. trachomatis*.

Цель исследования – получение ЛПС *C. trachomatis* простым, доступным в техническом исполнении способом, позволяющим улучшить качество выделяемого эндотоксина при одновременном уменьшении токсичности способа, и оценка влияния ЛПС в условиях *in vitro* на способность индуцировать ассоциированные с апоптозом, структурно-биохимические изменения в мембране сперматозоидов человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Липополисахариды получали из очищенных ЭТ *C. trachomatis* (серовар E), используя экстрагирование 90%-ным водным раствором фенола при 50 °С в течение 30 мин и центрифугирование смеси в течение 15 мин при 5000 об/мин. Полученный супернатант разводили 0,1 М трис-НСl буфером (рН 7,5) в соотношении 1:9. Выделение ЛПС *C. trachomatis* проводили, применяя аффинную хроматографию на конканавалин-А-сефарозе 4В («Pharmacia», Швеция) и дальнейшее элюирование ЛПС 0,45 М раствором N-ацетил-D-глюкозамина в трис-НСl буфере с рН=8,0. Фракции, содержащие ЛПС (качественная реакция с фенолом и серной кислотой), собирали, диализировали против дистиллированной воды, лиофилизировали и хранили при –20 °С [14].

Для доказательства выделения ЛПС *C. trachomatis* проводили электрофорез в 14%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с окраской геля азотнокислым серебром, а в качестве положительного контроля использовали ЛПС *E. coli* (серотип 055:B5, «Sigma», Великобритания). Химический состав ЛПС определяли общепринятыми методами: суммарные углеводы – по Дюбуа с тимолом и серной кислотой, белки – по Лоури, нуклеиновые кислоты – по Спирину.

Подтверждение чистоты полученного ЛПС *C. trachomatis* проводили обращённофазной высо-

коэффициентной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ) на хроматографическом комплексе Gilson («Gilson, Inc.», США).

Оценку влияния выделенного ЛПС, как одного из факторов патогенности *C. trachomatis*, на способность индуцировать апоптоз мужских половых клеток *in vitro* выполняли, используя эякуляты 25 здоровых фертильных мужчин в возрасте от 22 до 40 лет, давших согласие на проведение исследований.

Измерение показателей стандартной спермограммы (концентрации, подвижности, жизнеспособности и морфологии сперматозоидов) проводили в соответствии с рекомендациями и нормативами ВОЗ [15]. Результаты лабораторных исследований (бакпосевов, прямой иммуофлюоресценции) на наличие инфекций половых органов были отрицательными. Жизнеспособность клеток составила примерно 80% (определяли по отсутствию окрашиваемости клеток 3%-ным водным раствором эозина по Bloom).

Из каждого эякулята после его полного разжижения отбирали четыре аликвоты. Контрольные образцы отмытых в фосфатно-солевым буфере с рН=7,4 сперматозоидов (5×10^6 /мл) инкубировали в течение 6 ч в среде Menezo B-2 («BioMerieux», Франция) с 5%-ным CO₂ при 37 °С.

Сперматозоиды другой аликвоты инкубировали при тех же условиях и времени, что и контрольные образцы, но с добавлением в среду инкубации 0,1 мкг/мл ЛПС *C. trachomatis* (серовар E) (опыт), выделенного описанным выше способом. В качестве положительного контроля для индукции некроза третью аликвоту спермы нагревали до 56 °С в течение 1 ч. В качестве положительного контроля для индукции апоптоза проводили 6-часовую инкубацию сперматозоидов четвертой аликвоты спермы с 1 ммоль/л стауроспорина (STS) («Sigma», Великобритания).

Сразу после инкубации в контрольных и опытных образцах исследовали функционально-морфологические критерии качества гамет и определяли наличие маркера апоптоза – экстернализацию ФС на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны сперматозоидов, окрашивая клетки конъюгатом аннексина-V с флуорохромом (AnV-FITC) и йодистым пропидием (PI) («Boehringer Mannheim», Германия), согласно инструкции изготовителя. Мазки исследовали на флуоресцентном микроскопе МИКРОМЕД 3 ЛЮМ (Санкт-Петербург) под иммерсионным объ-

ективом с ув. $\times 100$. Подсчитывали количество (в процентах) живых неокрашенных (AnV–/PI–)-сперматозоидов; (AnV+/PI–)-сперматозоидов с признаками раннего апоптоза; нежизнеспособных мёртвых (AnV+/PI+)- и (AnV–/PI+)-сперматозоидов [10].

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программ «Statistica 6.1 for Windows» (StatSoft Inc.) и EXCEL-2007. После проверки распределения на нормальность (соответствие гистограмм распределения кривой Гаусса и метод Шапиро–Уилка) статистическую значимость различий сравниваемых величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при значении $p < 0,05$. Данные представляли в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученный препарат ЛПС *C. trachomatis* (серовар E) представлял собой хлопья белого цвета, хорошо растворяющиеся в воде, сахароза-фосфатном буфере или в 0,9%-ном растворе NaCl.

После выделения на конканавалин-A-сефарозе препарат ЛПС *C. trachomatis* гомогенен при электрофоретическом контроле чистоты (рис. 1).

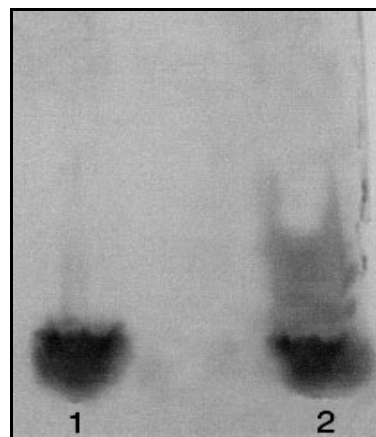


Рис. 1. Электрофореграмма ЛПС *C. trachomatis* и *E. coli* в ПААГ: 1 – ЛПС *C. trachomatis* (серовар E), полученный новым способом; 2 – ЛПС *E. coli* (серотип 055:B5, «Sigma»)

Предложенным способом выделения ЛПС *C. trachomatis* получен достаточно химически чистый от примесей других бактериальных компонентов и гомогенный ЛПС (содержание белка – 1%, нуклеиновые кислоты – отсутствуют). То есть улучшено качество препарата ЛПС, что одновременно дало возможность сократить применение ядовитых, трудноудаляемых и экологически вредных веществ.

Методом ОФ ВЭЖХ подтверждена чистота полученного препарата ЛПС *C. trachomatis*: анализ хроматограммы образца показал, что в препарате отмечается только один основной пик, что доказывает чистоту препарата ЛПС.

Качество полученного препарата бактериального токсина дало возможность оценить влияние ЛПС на мужские гаметы и доказать связь между нарушением фертильности клеток и структурно-биохимическими изменениями в их мембране, ассоциированными с апоптозом, после воздействия данного эндотоксина. Важным при этом являлось создать оптимальные условия, близкие к физиологическим, при которых мужские гаметы подвергаются влиянию ЛПС в инфицированном хламидиями организме. В физиологических условиях концентрация ЭТ в инфицированном организме может меняться в зависимости от стадии цикла развития *C. trachomatis*, реакции самого организма и других факторов, и на момент выделения ЭТ из инфицированной клетки их концентрация может быть достаточно высока.

В зависимости от чувствительности используемых в практике методов лабораторной диагностики хламидийной инфекции, положительные образцы должны содержать $\geq(10^4-10^5)$ элементарных тел *C. trachomatis*. Концентрация $0,54 \times 10^6$ ЭТ *C. trachomatis* близка к той, при которой гаметы подвергаются влиянию ЭТ в инфицированном *C. trachomatis* организме и соответствует концентрации ЛПС 0,1 мкг/мл [2, 5].

После 6 ч инкубации гамет в среде без добавления ЛПС (контроль) подвижность сперматозоидов, количество живых (AnV-/PI-)-гамет и мёртвых (AnV+/PI+)-, (AnV-/PI+)-клеток, а также (AnV+/PI-)-гамет с признаками раннего апоптоза статистически значимо не изменялось по сравнению со свежевыделенными гаметами ($p > 0,05$).

После воздействия высокой температуры статистически достоверным было увеличение количества мёртвых сперматозоидов, в основном за счёт увеличения количества (AnV-/PI+)-клеток от $16,3 \pm 1,1\%$ в контроле до $66,2 \pm 1,7\%$ ($p < 0,001$). При этом изменение количества (AnV+/PI-)-клеток было статистически недостоверно по сравнению с контролем ($p > 0,05$) (рис. 2).

Выявлено, что 1 ммоль/л STS вызывал выраженный апоптотический эффект: количество (AnV+/PI-)-клеток увеличивалось в 5 раз по сравнению с контролем ($p < 0,001$) и достигало почти 50%.

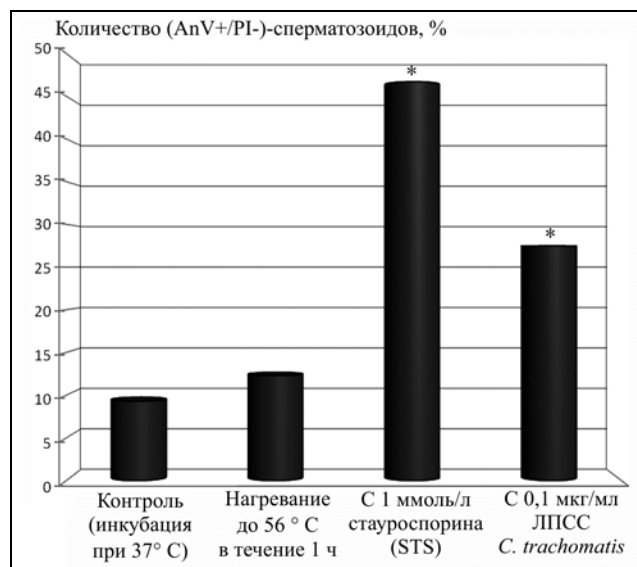


Рис. 2. Изменение количества (AnV+/PI-) - сперматозоидов после инкубации мужских гамет в течение 6 ч (* - $p < 0,001$ достоверно по сравнению с контролем)

Также происходило увеличение числа мёртвых (AnV+/PI+)-клеток почти в 2 раза по сравнению с контролем до уровня $12,1 \pm 1,1\%$ ($p < 0,001$), но возрастание количества (AnV-/PI+)-клеток было статистически недостоверно по сравнению с контролем ($p > 0,05$), однако меньше, чем после воздействия на гаметы высокой температуры ($p < 0,001$).

После 6 ч инкубации гамет с ЛПС *C. trachomatis* (серовар E) наблюдалось уменьшение числа активно подвижных гамет в 1,5 раза и увеличение процентного содержания (AnV+/PI-)-сперматозоидов в 3 раза по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Однако апоптотическое действие ЛПС проявлял слабее, чем STS ($p < 0,001$). Снижение подвижности гамет после воздействия ЛПС *C. trachomatis* было связано с повышением количества мёртвых (AnV+/PI+)- и (AnV-/PI+)-сперматозоидов, однако это увеличение было статистически недостоверно по сравнению с контролем ($p > 0,05$). Число мёртвых (AnV-/PI+)-гамет после воздействия эндотоксина было меньше, чем после воздействия высокой температуры ($p < 0,001$).

Таким образом, обнаружено различие в подвижности гамет и процентном содержании (AnV+/PI-)-сперматозоидов между контролем и опытом.

Можно предположить, что процесс апоптоза сперматозоидов в мужском половом тракте (а также при попадании в женский) запускается для предотвращения передачи генетических дефектов,

так как инфицирование *C. trachomatis* может повлиять на нормальное развитие эмбрионов, если оплодотворение будет успешным.

Вследствие этого изучение ЛПС *C. trachomatis* и их способности влиять на фертильность и жизнеспособность половых клеток, активируя процесс апоптоза гамет, открывает перспективы для разработки различных подходов в диагностике мужского и женского бесплодия, а также этиотропной и патогенетической терапии. Изучение ЛПС как бактериальных факторов представляется принципиально важным в свете поиска новых подходов к лечению и профилактике хронических инфекций.

Необходимым для подтверждения данных, полученных в условиях *in vitro*, являются дальнейшие исследования у инфицированных *C. trachomatis* мужчин, у которых хламидиоз приводит к ухудшению качества спермы.

ВЫВОДЫ

1. Наличие у *C. trachomatis* механизмов и способности влиять на фертильность и жизнеспособность сперматозоидов, приводя к бесплодию, реализуется посредством действия её структурных компонентов ЛПС – токсических эндотоксинов.
2. Действие ЛПС *C. trachomatis* (серовар E) на мужские гаметы заключается в снижении подвижности половых клеток и активации апоптоза, ранним признаком которого являются структурно-биохимические изменения в мембране сперматозоидов, связанные с нарушением фосфолипидной асимметрии мембраны и перемещением ФС на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубровина С.О. Роль хламидий в этиологии воспалительных заболеваний органов малого таза // Акушерство и гинекология. 2017. № 2. С. 119–124.

2. Плосконос М.В., Николаев А.А. Влияние липополисахаридов *Chlamydia trachomatis* на апоптоз сперматозоидов и развитие мужского бесплодия (обзор) // Урология. 2014. № 1. С. 84–87.
3. Божедомов В.А., Семенов А.В., Коньшев А.В. Репродуктивная функция мужчин при хроническом простатите: клинико-anamnestические и микробиологические аспекты // Урология. 2015. № 1. С. 70–78.
4. Есинов А.С. Параметры эякулята у мужчин с репродуктивно значимыми инфекциями генитального тракта // Проблемы репродукции. 2007. № 4. С. 64–69.
5. Hosseinzadeh S., Eley A., Pacey A.A. Semen quality of men with asymptomatic chlamydial infection // J. Androl. 2004. № 25. С. 104–109.
6. Sanocka-Maciejewska D., Ciupinska M., Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality // J. Reprod. Immunol. 2005. № 67. С. 51–56.
7. Byrne G.I., Ojcius D.M. Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen // Nature Reviews Microbiology. 2004. № 2. С. 802–808.
8. Плосконос М.В. Исследование экспрессии белков – маркеров апоптоза Fas и FasL на человеческих сперматозоидах // Проблемы репродукции. 2015. Т. 21. №2. С. 94–97.
9. Белушкина Н.Н., Хасан Хамад А., Северин С.Е. Молекулярные основы апоптоза // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 1998. № 4. С. 15.
10. Плосконос М.В. Экстернализация фосфатидилсерина на поверхность мембран сперматозоидов под действием оксидативного стресса // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9. №№1(1)(18). С. 156–157.
11. Немцова М.В., Быков И.И., Чекунова Н.В., Залетаев Д.В., Глухов А.И., Хоробрых Т.В. Системы молекулярно-генетических маркеров при раке желудка // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 10. С. 67–72.
12. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraktion with phenol-water and further applications of the procedure // Methods Carbohydr. Chem. 1965. № 5. С. 83–91.
13. Захарова И.Я., Варбанец Л.Д. Углеводсодержащие биополимеры мембран бактерий. Киев: Наук. Думка. 1983. 128 с.
14. Плосконос М.В., Николаев А.А. Способ выделения липополисахарида *Chlamydia trachomatis*. Патент РФ № 2593946 от 13.04.2015 г.
15. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. 5th ed. WHO (Geneva).

Поступила 13 августа 2018 г.

THE OBTAINING LIPOPOLYSACCHARIDE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* AND ASSESSING ITS EFFECT ON HUMAN SPERMATOZOA

© M.V. Ploskonos, 2018

M.V. Ploskonos

Dr.Sc. (Biol.), Associate Professor, Department of Chemistry,
Astrakhan State Medical University Health Ministry of Russian Federation
E-mail: ploskonoz@mail.ru

The aim of the study was to assess the effect of *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide (LPS) on the fertility and viability of gametes under *in vitro* conditions. A new method for the preparation of *C. trachomatis* LPS is proposed, based on affinity chromatog-

raphy on concanavalin A-Sepharose, which allows to improve the quality of endotoxin, while reducing the toxicity of the method. The spermatozoa of 25 fertile men were incubated for 6 hours with 0.1 µg / ml LPS *C. trachomatis* (serovar E). The externalization of phosphatidylserine (PS) was determined by staining spermatozoa with conjugated with fluorochrome annexin-V and propidium iodide followed by fluorescence microscopy. The ability of *C. trachomatis* LPS to decrease the motility of gametes and induce externalization of PS is revealed, which is an early sign of apoptosis. LPS, as one of the pathogenicity factors of *C. trachomatis*, is able to exert a cytotoxic effect on human spermatozoa, inducing apoptosis-associated structural and biochemical changes in the sperm membrane and reducing gamete fertility.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, lipopolysaccharides, spermatozoa, fertility, apoptosis, phosphatidylserine.

For citation: Ploskonos M.V. The obtaining lipopolysaccharide *Chlamydia trachomatis* and assessing its effect on human spermatozoa. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(11):51–56. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-11-08>

REFERENCES

- Dubrovina S.O. Rol' hlamidij v etiologii vospalitel'nyh zabolevanij organov malogo taza // Akusherstvo i ginekologiya. 2017. № 2. S. 119–124.
- Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. Vliyanie lipopolisaharidov Chlamydia trachomatis na apoptoz spermatozoidov i razvitie muzhskogo besplodiya (obzor) // Urologiya. 2014. № 1. S. 84–87.
- Bozhedomov V.A., Semenov A.V., Konyshov A.V. Reproaktivnaya funkciya muzhchin pri hronicheskom prostatite: kliniko-anamnesticheskie i mikrobiologicheskie aspekty // Urologiya. 2015. № 1. S. 70–78.
- Esipov A.S. Parametry eyakulyata u muzhchin s reproduktivno znachimymi infekciyami genital'nogo trakta // Problemy reprodukcii. 2007. № 4. S. 64–69.
- Hosseinzadeh S., Eley A., Pacey A.A. Semen quality of men with asymptomatic chlamydial infection // J. Androl. 2004. № 25. P. 104–109.
- Sanocka-Maciejewska D., Ciupinska M., Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality // J. Reprod. Immunol. 2005. № 67. P. 51–56.
- Byrne G.I., Ojcius D.M. Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen // Nature Reviews Microbiology. 2004. № 2. P. 802–808.
- Ploskonos M.V. Issledovanie ekspressii belkov – markyrovov apoptoza Fas i FasL na chelovecheskih spermatozoidah // Problemy reprodukcii. 2015. T. 21. № 2. S. 94–97.
- Belushkina N.N., Hasan Hamad A., Severin S.E. Molekulyarnye osnovy apoptoza // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 1998. № 4. S. 15.
- Ploskonos M.V. Eksternalizaciya fosfatidilserina na poverhnost' membran spermatozoidov pod dejstviem oksidativnogo stressa // Rossijskij immunologicheskij zhurnal. 2015. T. 9. № 1(1)(18). S. 156–157.
- Nemcova M.V., Bykov I.I., Chekunova N.V., Zaletaev D.V., Gluhov A.I., Horobryh T.V. Sistemy molekulyarno-geneticheskikh markerov pri rake zheludka // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2013. № 10. S. 67–72.
- Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraktion with phenol-water and further applications of the procedure // Methods Carbohydr. Chem. 1965. № 5. P. 83–91.
- Zaharova I.Ya., Varbanec L.D. Uglevodsoedzhashchie biopolimery membran bakterij. Kiev: Nauk. dumka, 1983. 128 s.
- Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. Sposob vydeleniya lipopolisaharida Chlamydia trachomatis. Patent RF № 2593946 ot 13.04.2015.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. 5th ed. WHO (Geneva).



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Элеутерококк (сухой экстракт, таблетки, покрытые оболочкой) (рег. № № 92/210/3; 92/210/7) – общетонизирующее средство, получаемое из корневищ и корней элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.).

Сабельник болотный (*Comarum palustre*) (экстракт сухой, таблетки, гель) – оказывает противовоспалительное, анальгезирующее действие. Применяется в комплексной терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Флакозид (таблетки) (рег. №№ 90/248/3; 90/248/7) – противовирусное и антигепатотоксическое средство, получаемое из листьев бархата амурского и бархата Лавалля (*Phellodendron amurense* и *Phellodendron amurense* var. *Lavallei* Sprague). Применяется для лечения вирусных гепатитов.

Эвкалимин (раствор, суппозитории для детей и взрослых) (рег. №№ 90/249/2; 91/194/13; 91/194/12) – антибактериальное и противовоспалительное средство, получаемое из эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru