

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА



И. И. Мечников

ИММУНОЛОГИЯ

Двухмесячный научно-теоретический журнал
ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1980 г.

Главный редактор академик РАН и РАМН Р. М. ХАИТОВ

*Журнал входит в перечень периодических научно-технических изданий,
выпускаемых в Российской Федерации, в котором рекомендуется
публикация основных результатов диссертаций на соискание
ученой степени доктора наук*

Адрес редакции:
Москва,
ул. Б. Пироговская, 2/6, стр. 18

Зав. редакцией журнала
Галина Ивановна ГАВРИКОВА

тел. 248-75-73

Том 27

4

2006

ИЮЛЬ—АВГУСТ

Москва «Издательство "Медицина"»



но-опосредованного иммунитета имеет непродолжительный характер и супрессируется продукцией противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10 и трансформирующего фактора роста β . Раннее подавление функций клеточного звена, в первую очередь продукции ИФН- γ Th1-лимфоцитами, способствует апоптозу макрофагов и распространению патогена через базолатеральные мембраны эпителиальных клеток. В связи с этим представляет интерес модулирующая активность ЛАБ при моделировании шигеллезной инфекции [2, 3, 5, 6, 10].

Результаты проведенной работы свидетельствуют о том, что предварительное пероральное введение ЛАБ мышам СВА и последующее их заражение *S. dysenteriae* SC500 (inv⁺tox⁺) оказывает комплексное воздействие на систему ИФН, усиливая продукцию сывороточного ИФН, а также ИФН- α и ИФН- γ клетками лимфоидных органов, по сравнению с аналогичными показателями у животных без предварительной сенсибилизации ЛАБ (см. рис. 2, а). Динамика изменений титров ИФН зависит от штамма ЛАБ. Бактерии *L. fermentum* 2998, введенные до заражения животных, оказывают наибольшее индуцирующее влияние на синтез данных цитокинов.

Способность ЛАБ стимулировать продукцию ИФН- α предполагает активацию клеток моноцитарно-макрофагального ряда и В-лимфоцитов, что способствует элиминации патогена на ранних этапах заражения и усилению гуморального ответа на более поздних стадиях развития инфекции.

Рост титров ИФН- γ при предварительном введении ЛАБ мышам СВА и последующем их заражении вирулентным штаммом *S. dysenteriae* SC500 предполагает способность ЛАБ усиливать и поддерживать ИФН- γ -ответ при разворачивании инфекционного процесса. Это связано с усилением функциональной активности Th1-лимфоцитов и снижением чувствительности к *Shigella*.

Нами выявлено усиление продукции ИФН клетками лимфоидных органов мышей СВА, зараженных *S. dysenteriae* SC500, при дополнительной стимуляции ВБН и ФГА Р в условиях *in vitro* (рис. 2, б). Рост титров ИФН- α в опытной группе по

сравнению с интактным контролем, вероятно, обусловлен активацией клеток моноцитарно-макрофагального ряда и В-лимфоцитов липополисахаридом и токсином *S. dysenteriae* SC500. Усиление синтеза ИФН- γ , по данным литературы, связано с активацией инвазивными естественными киллерными клетками и Th1-лимфоцитами макроорганизма [5, 6, 10].

Напротив, дополнительная стимуляция клеток ПБ, селезенки и тимуса мышей с предварительным введением ЛАБ, зараженных в последующем *S. dysenteriae* SC500, не оказывает индуцирующего влияния на продукцию ИФН- α и ИФН- γ (см. рис. 2, б). Данный эффект, вероятно, связан с развитием депрессии иммунореактивности иммуокомпетентных клеток в условиях избытка антигенов.

Таким образом, бактерии рода *Lactobacillus* оказывают непосредственное индуцирующее действие на продукцию ИФН- α и ИФН- γ и усиливают синтез цитокинов в ответ на дополнительную стимуляцию клеток лимфоидных органов специфическими индукторами ИФН. ЛАБ усиливают функциональную активность клеточного звена иммунитета и поддерживают продолжительный ИФН-ответ при экспериментальной шигеллезной инфекции, что является одним из определяющих механизмов их протективного эффекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорян С. С. // *Вопр. вирусол.* — 1984. — Т. 33, № 4. — С. 433—436.
2. Фрейдлин И. С. // *Иммунология.* — 2001. — № 5. — С. 4—7.
3. Ярилин А. А. // *Иммунология.* — 1997. — № 5. — С. 7—14.
4. Ericson K. L., Hubbard N. E. // *J. Nutr.* — 2000. — Vol. 130, N 2. — P. 403—409.
5. Hathaway L. J. et al. // *Infect. and Immun.* — 2002. — Vol. 70, N 7. — P. 3833—3842.
6. Hughes A. K. et al. // *Nephron.* — 2001. — Vol. 88, N 1. — P. 14—23.
7. Isolauri E. et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2001. — Vol. 73, N 2. — P. 444—450.
8. Meydani S. et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2000. — Vol. 71, N 4. — P. 861—872.
9. Monteleone I. et al. // *Gut.* — 2002. — Vol. 50, N 3. — P. 60—64.
10. Samandari T. et al. // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164, N 2. — P. 2221—2232.

Поступила 28.12.05

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 579.882.11.083.3

К. В. Пичужкин, В. Г. Григоренко, О. В. Колясников, Е. М. Гаврилова,
И. В. Упоров, В. В. Писарев, А. М. Егоров, Ю. П. Финашутина,
В. Н. Лазарев, В. М. Говорун

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ МОМР (ОСНОВНОЙ БЕЛОК НАРУЖНОЙ ОБОЛОЧКИ МЕМБРАНЫ) CHLAMYDIA PNEUMONIAE И ЕГО ЭПИТОПОВ

Государственный научный центр по антибиотикам, ФГУП ГНЦА, Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава, ООО НПФ "Литех"

Chlamydia pneumoniae является возбудителем инфекций респираторного тракта, таких как пневмония и бронхит. В настоящее время инфицирование данным возбудителем ассоциируют с развитием эндокардита и астмы. Появились данные о том, что развитие ишемической болезни сердца и атеросклероза строго коррелирует с наличием *Ch. pneumoniae*. Принцип диагностики хламидийной инфекции заключается в определении антител классов IgM, IgA и IgG, образующихся при инфицировании. Белок MOMP (major outer membrane protein — основной белок наружной оболочки мембраны) *Ch. pneumoniae* является видоспецифическим антигеном и обладает 68 и 71% гомологии с подобными белками соответственно *Ch. trachomatis* и *Ch.*

psittaci. Авторами разработана система экспрессии гена MOMP и его эпитопов на основе клеток *E. coli*; методом иммуноферментного анализа было также изучено распределение специфических к *Ch. pneumoniae* антител класса IgM на основе рекомбинантного MOMP и его эпитопов (D, E, F). Проведен сравнительный анализ образцов сывороток крови пациентов, в котором определяли титр специфических к *Ch. pneumoniae* антител в сравнении с коммерческим набором фирмы "Savyon".

Chlamydia pneumoniae is a human respiratory pathogen. Chlamydia pneumoniae infection is associated with a number of chronic diseases such as asthma, bronchitis, pneumonia, atherosclerosis, etc... Laboratory diagnosis of this infection is based on isolation of agent, serology, and/or DNA detection by PCR. It has been proved that serology i.e. primarily the detection of serum antibodies is the most specific and sensitive test for Chlamydia pneumoniae diagnosis. The major outer membrane protein (MOMP) of Ch. Pneumoniae being genus-specific antigen possesses 68% and 71% homology with proteins of Chlamydia trachomatis and Chlamydia psittaci respectively. To investigate the humoral immune response to MOMP of Ch. pneumoniae recombinant full length MOMP and its four epitopes (D, E, F) have been produced in E.coli for ELISA establishment. Specific IgM antibodies against Chlamydia pneumoniae have been determined in sera from patients with active phase of respiratory disease diagnosis. The comparative analysis of patients' blood serum samples has been carried out and specific obtained data have been compared with abovementioned data by commercial ELISA test from Savyon.

Chlamydia pneumoniae впервые была выделена в 1965 г. и классифицирована как вид рода *Chlamydia* в 1986 г. [1, 4, 10, 13, 16]. Хламидии являются внутриклеточными грамотрицательными бактериями, колонизирующими слизистые оболочки человека. Принцип диагностики хламидийной инфекции заключается в определении антител классов IgM, IgA и IgG, образующихся при инфицировании.

и IgG, образующихся при инфицировании Ch.pneumoniae является возбудителем инфекций респираторного тракта, таких, как пневмония и бронхит. В настоящее время инфицирование данным возбудителем ассоциируют с развитием эндокардита и астмы. Появились данные о том, что развитие ишемической болезни сердца и атеросклероза строго коррелирует с наличием Ch.pneumoniae [7, 9, 18, 20, 22].

Белок MOMP (major outer membrane protein — основной белок наружной оболочки мембраны) *Ch.pneumoniae* является видоспецифическим антигеном и обладает 68 и 71% гомологии с подобными белками соответственно *Ch. trachomatis* и *Ch. psittaci*. В отличие от белка MOMP *Ch. trachomatis*, который чрезвычайно иммуногенен, подобный белок *Ch.pneumoniae* не является иммунодоминантным. Однако существуют данные по получению антител к этому белку, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью в иммуноблоттинге [5, 8, 14, 15, 23]. Вместе с тем получение рекомбинантного белка MOMP *Ch.pneumoniae* и его использование в качестве антигена при иммуноферментном определении антител классов IgG, IgA и IgM к возбудителю *Ch.pneumoniae* в сыворотке крови человека является чрезвычайно актуальной задачей.

Настоящая работа посвящена конструированию рекомбинантных плазмидных векторов, в составе которых находятся гены, кодирующие полноразмерный белок MOMP *Ch. pneumoniae*, а также его эпитопы, для экспрессии этих белков в клетках *E. coli* с целью изучения потенциальных антигенных структур *Ch. pneumoniae* в качестве рекомбинантных белков с последующей очисткой и использованием полученных антигенов для иммуноферментного определения антител к возбудителю *Ch. pneumoniae* в сыворотке крови человека.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *E. coli* DH5 α , B834(DE3), BL21(DE3)pLysS ("Novagen", США), плазмидные векторы pET15b, pET32a(+/-) ("Novagen", США), pGEM-Teasy ("Promega", США). Клетки *E. coli* выращивали на жидкой и плотной питательных средах LB. В качестве матрицы для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали геномную ДНК *Ch. pneumoniae* (штамм TW-183).

Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E. coli* методом щелочного лизиса с использованием набора реагентов для выделения плазмид фирмы "Qiagen" (США).

Гидролиз и лигирование (ДНК-лигаза фага Т4) ДНК проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя соответствующих ферментов ("Fermentas", Литва). Время инкубации составляло от 1 до 4 ч при 37°C.

состояли от 1 до 4 ч при 37°C.

Разделение фрагментов ДНК проводили, как описано в работе [2], методом электрофореза в горизонтальных агарозных гелях с концентрацией агарозы от 1 до 3%. Электрофорез проводили при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере (0,04 М трис-ацетат pH 8,1, 0,002 М ЭДТА) с содержанием 0,05 мг/мл бромистого этидия при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30—60 мин.

Препаративное разделение фрагментов ДНК проводили в 0,8% агарозном геле. Фрагменты выделяли из геля методом электролиза [2]. Полученный раствор ДНК экстрагировали смесью фенол-хлороформ и хлороформом, после чего осаждали этанолом. Эффективность элюции контролировали методом электрофореза в агарозном геле.

Для трансформации клеток лабораторных штаммов *E. coli* DH5 α использовали метод D. Hanahan [11]. Эффективность трансформации составляла от 10^7 до $5 \cdot 10^8$ трансформантов на 1 мкг суперскрученной ДНК плазмиды рUC19.

При клонировании фрагментов ДНК в плазмидных векторах для поиска рекомбинантов использовали методы контрелекции на средах с антибиотиками и метод скрининга рекомбинантов с использованием IPTG и X-gal.

Нуклеотидную последовательность клонированных генов определяли по методу Сэнгера [21] с использованием набора для термочисленного секвенирования Big Dye™ Terminator v.3.0 Cycle Sequencing ("Applied Biosystem", США). Реакцию проводили в объеме 20 мкл, содержащем 10 нг плазмидной или геномной ДНК, 3,2 пМ специфического праймера и реакционную смесь, предоставленную производителем (Terminator Ready Reaction Mix).

Продукты реакции анализировали с использованием автоматического секвенатора "ABM Prism Genetic Analyzer 3100" ("Applied Biosystem"; "Hitachi, Япония).

ПЦР проводили в автоматическом режиме на приборе "Терцик" ("ДНК-Технология", Россия). Для амплификации использовали полимеразу Pfu ("Boehringer", Германия) в смеси с Taq ("Fermentas") согласно инструкции фирм-производителей. Параметры амплификации: периодическая денатурация — 93°C, 30 с; отжиг праймеров с матрицей — 65°C, 30 с; синтез комплементарных цепей — 72°C, 1 мин. Всего проводили 30 циклов реакции.

Синтез дезоксирибонуклеотидов проводили фосфоамидитным способом на автоматическом синтезаторе ASM-700 ("BIOSSET", Россия) на базе НПФ "Литех".

— праймеры для клонирования гена *momp Ch.pneumoniae* без сигнального пептида в плазмиду pET32a(+) по сайтам NcoI. SalI:

SalI:
moNcoI 5'-GCCATGGCTTTGCTGTAGGGAACCCCTTC-3',
moSalI 5'-GCTGTGCAGCTTAAGAACTGAAGTACGACGAC-3',
— олигонуклеотиды для клонирования D-эпитопа (рис. 1)
гена *topm* в плазмиду pET032(+) по сайтам BamHI, EcoRI:
D1 5'-GATCCAAATGGTCACTATCGACAAGCTCGTT-
TAATTAA-3',
D2 5'-CGAGAGAGCTGCTCAAGTATCTGGTCASTTCA-
GATTTCAAG-3',
D3 5'-GTGAGCAGCTCTCTCGTTAATTAAACGAGCTTCT-
GCAGTAAGTGACCATTTG-3',

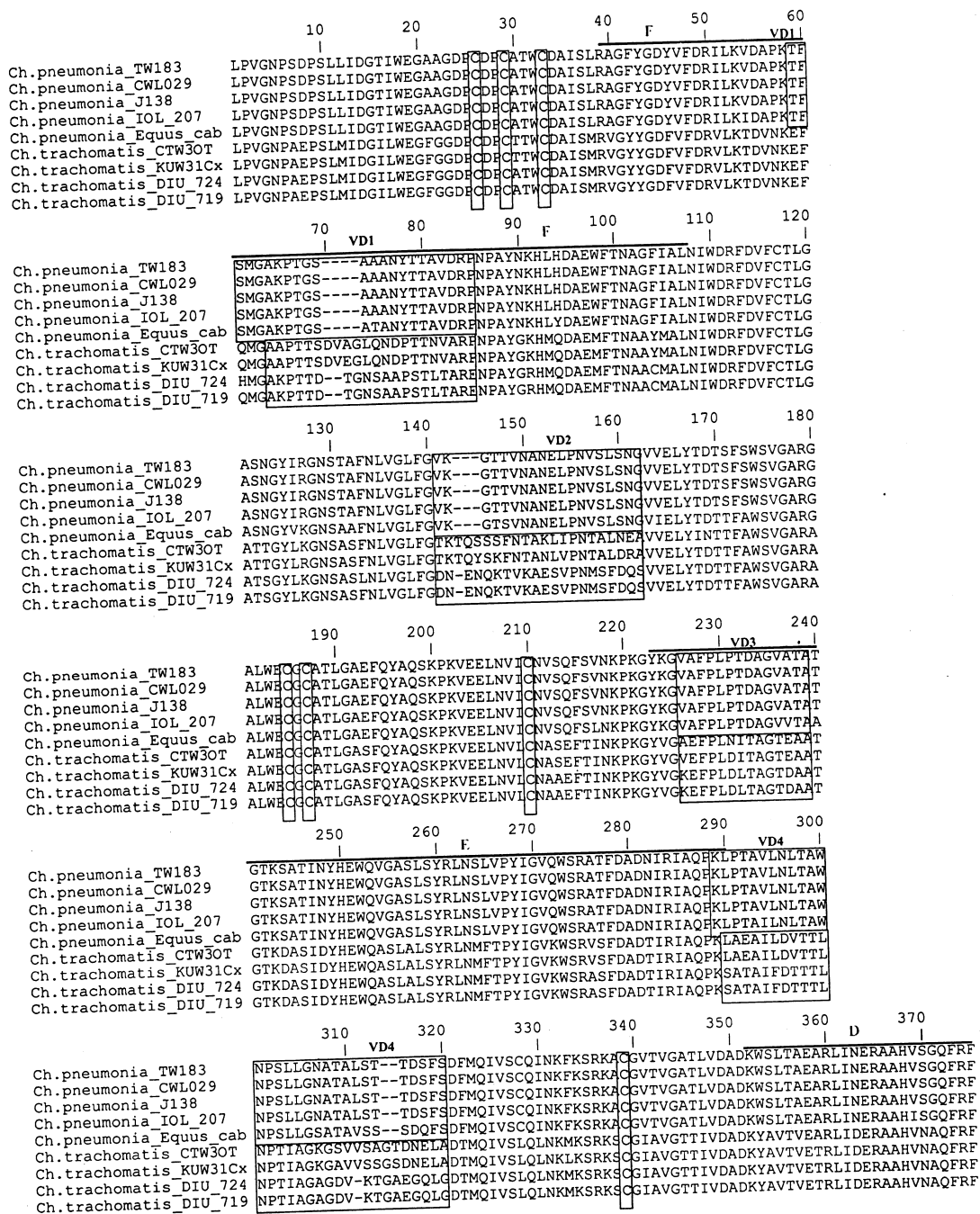


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей MOMP Ch. trachomatis и Ch. pneumoniae различных штаммов. Сплошными линиями сверху обозначены эпитопы D, E, F. Серым цветом выделены цистеины и 4 вариабельных домена (VD1, cD2, cD3, VD4).

Ch.pneumoniae TW183 — (NP_876994, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=33242053>); Ch.pneumoniae CWL029 — (NP_224891, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=15618605>); Ch.pneumoniae J138 — (NP_300751, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=1291125>); Ch.pneumoniae IOL-207 — (P27455, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=289841>); Ch.trachomatis CTW30T — (AF352789, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=14029595>); Ch.trachomatis KUW31Cx — (AF063204, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=11561787>); Ch.trachomatis DIU-724 — (AF063196, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=11561787>); Ch.trachomatis DIU-719 — (AF063196, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=11561787>).

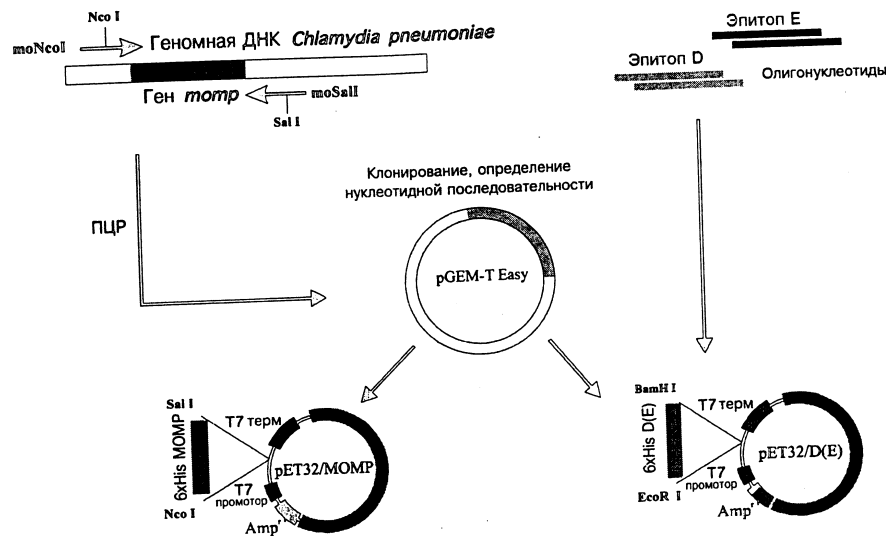


Рис. 2. Схема конструирования плазмидных векторов, экспрессирующих гены *momp* *Ch.pneumoniae* и эпипептиды этого белка.

D4 5'-AATTCTTAGAATCTGAACTGACCAGATAC-3';
 — олигонуклеотиды для клонирования E-эпипептида (см. рис. 1)
 1) гена *momp* в плазмиду pET-32(+) по сайтам BamHI, EcoRI:
 E1 5'-GATCCAAAGGCGTTGCTTTCCCTTGCCAAACA-
 GACGCTGGCGTAGCAACAG-3';
 E2 5'-CTACTGGGAACAAAGTCTGCGACCATCAATTATCA-
 TGAATGGCAAGTAGGAGCCCTCTCTATCTTAC-3';
 E3 5'-AGACTAACTCTTTAGTGCCATACATTGGAGTAC-
 AATGGTCTCGAGCAACTTTGATGCTGATAACATCTAAG-3';
 E4 5'-CGCAGACTTTGTTCCAGTAGCTGTTGCTACGCC-
 AGCGTCTGTTGGCAAGGGGAAAGCAACGCCCTTG-3';
 E5 5'-GGCACTAAAGAGTTTATGCTGTAAGATAGAGAG-
 GCTCTACTTGCCATTCATGATAATTTGATGGT-3';
 E6 5'-AATTCTTAGATGTTATCAGCATCAAAAGTTGCTC-
 GAGACATTGTACTCCAATGTAT-3'.

После трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3) отбирали колонии и инокулировали в 20 мл среды LB (100 мкг/мл ампициллина) и инокулировали в течение ночи. Далее в 100 мл среды LB инокулировали 2 мл затравки и растили до достижения ОП₆₀₀ = 0,6 с использованием шейкера (180 об/мин) при 28°C. После этого к клеткам добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и инокулировали в течение 18 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 15 мин при 4°C. Клетки однократно промыли 1 мМ трис-HCl, 1 мМ EDTA pH 8,0. Осадок клеток ресуспендировали в 5 мл буфера 1 (20 мМ Na-фосфат (Na₂HPO₄·2H₂O, NaH₂PO₄·H₂O, 0,5 М NaCl, 10 мМ имидазол, 8 М мочевины pH 7,4). Далее клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора ("Branson Sonifier", Англия) 3 раза по 15с. Разрушенные клетки центрифугировали при 15 000 об/мин, супернатант фильтровали (фильтр 0,22 мкм, "Millipore", Франция) и наносили на колонку HisTrap мкм, "Amersham", Англия). Колонку промывали 10 мл буфера 1, рекомбинантный белок элюировали 5 мл (фракциями по мл) буфера 2 — 20 мМ Na-фосфат (Na₂HPO₄·2H₂O, NaH₂PO₄·H₂O), 0,5 М NaCl, 500 мМ имидазол, 8 М мочевины pH 7,4. Отобранные фракции анализировали с помощью электрофореза в ПААГ-ДСН. Далее проводили диализ против буфера 1 в течение ночи при 4°C.

ДСН-электрофорез в ПААГ проводили в буферной системе Леммли [17] в пластинах толщиной 0,75 и 1,5 мм на аппарате "Mighty Small2" ("Hoefel", Германия). Разделяющий гель содержал от 10 до 15% акриламида при 0,8% сшивке N, N-метиленбисакриламидом, 0,375 М трис-HCl pH 8,8 и 0,1% додецилсульфата натрия. Электродный буфер содержал 25 мМ трис, 0,192 мМ

глицина, 0,1% додецилсульфата натрия pH 8,4. Лизирующий буфер содержал 0,125 М трис-HCl pH 6,8, 4% додецилсульфата натрия, 50 мМ дитиотреитол, 0,01% бромфенолового синего и 20% глицерина. Образцы прогревали 5 мин при 95°C и наносили в лунки фокусирующего геля (4% акриламида, 3% N,N-метиленбисакриламида и 0,125 М трис-HCl pH 6,8). Электрофорез проводили при силе тока 20 мА до достижения бромфеноловым синим нижней границы разделяющего геля.

Образцы крови пациентов пульмонологического отделения (в анамнезе — различные формы пневмоний, хронический бронхит и другие патологии легких) предоставлены Центральной клинической больницей № 7 (Москва), а также Российским кардиологическим научно-производственным комплексом Минздрава РФ. Они были получены от мужчин в возрасте от 33 до 75 лет; все пациенты — больные ИБС со II, III, IV функциональным классом (ФК) стенокардии (оценку тяжести стенокардии и определение ФК осуществляли согласно критериям Канадского общества кардиологов) без инфаркта миокарда в анамнезе или с постинфарктным кардиосклерозом. В качестве контроля были исследованы образцы донорских сывороток из Московской областной станции переливания крови. Определение уровня антител к *Ch.pneumoniae* проводили на базе Государственного научного центра антибиотиков.

Специфические антитела классов IgG, IgA и IgM определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на наборах реагентов SeroCPTM (ELISA) фирмы "Savyon" (Израиль). В основе метода лежит схема непрямого анализа с использованием в качестве иммобилизованного антигена очищенных элементарных тел *Ch.pneumoniae* (Tw tm-183). Процедуру определения антител проводили в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору.

Сорбцию рекомбинантных антигенов осуществляли в карбонатном буфере (0,01 М; 0,2756 г/л Na₂CO₃ + 0,84 г/л NaHCO₃ pH 9,5—9,6) при различных разведениях полученных рекомбинантных антигенов (MOMP и эпипептиды; от 1:100 до 1:500; 40–200 нМ) в течение ночи при 4°C. Были использованы полистироловые планшеты высокой сорбционной емкости фирмы "Greiner" (Австрия). Измерение оптической плотности на длине волны 450 нм проводили с помощью фотометра для определения оптического поглощения в лунках микропланшета "Antos 2020" (Австрия).

Для предсказания пространственной структуры использовали программу THREADER 3 (<http://bioinf.es.cl.ac.uk>).

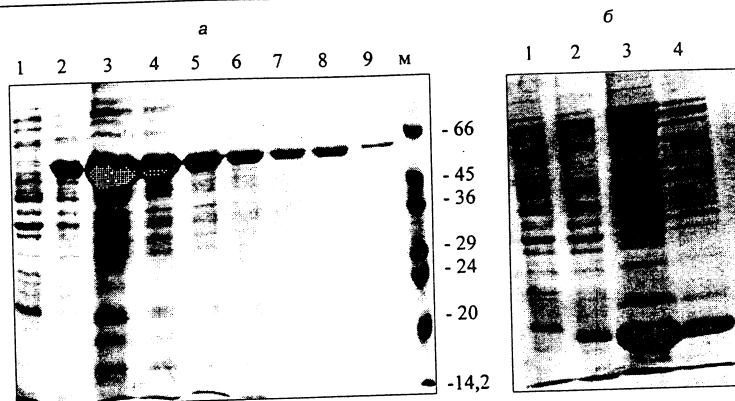


Рис. 3. Электрофореграмма фракций после очистки полноразмерного белка MOMP и эпитопов D, E, G.

а: 1 — *E. coli* штамм BL21 (DE3), трансформированные контрольной плазмидой рЕТ32a(+) (грубый лизат); 2 — *E. coli* штамм BL21(DE3), трансформированные плазмидой рЕТ32/MOMP (грубый лизат); 3–9 — полноразмерный белок после элюирования с колонки; 4, М — маркер молекулярной массы (SDS-7, 14–66 кД "Sigma"). б: 1 — *E. coli* штамм BL21(DE3), трансформированные контрольной плазмидой рЕТ32a(+) (грубый лизат); 2 — *E. coli* штамм BL21 (DE3), трансформированные плазмидой рЕТ32/D (грубый лизат); 3, 4 — эпитоп D14 после элюирования с колонки.

Результаты и обсуждение. Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей MOMP *Ch. trachomatis* и *Ch. pneumoniae*, полученные с использованием компьютерной программы MULTALIN multiple alignment, <http://npsa-rbil.ibcp.fr> [6] и приведенные на рис. 1, свидетельствуют о полном совпадении аминокислотных последовательностей для 5 различных видов *Ch. pneumoniae*.

При выборе аминокислотных последовательностей предполагаемых эпитопов MOMP (D, E, F) также были проанализированы данные, полученные в работе [23].

Вектор рЕТ32a(+) обеспечивает экспрессию целевого гена в виде составного белка со 109 аминокислотными остатками тиоредексина для повышения растворимости и стабильности рекомбинантного белка. Наличие 6 остатков гистидина позволяет использовать металлохелатную аффинную хроматографию для дальнейшей очистки рекомбинантного белка. Схема клонирования представлена на рис. 2. В результате были получены следующие конструкции: рЕТ32/momp (полноразмерный MOMP), рЕТ32/D, рЕТ32/E и рЕТ32/F (соответственно эпитопы D, E и F; см. рис. 1 и 2).

Для экспрессии рекомбинантных белков — полноразмерного MOMP и его эпитопов *Ch. pneumoniae* использовали рекомбинантные плазмидные векторы рЕТ32/MOMP, рЕТ32/D и рЕТ32/E и штамм клеток *E. coli* BL21(DE3). Электрофореграммы фракций после очистки полноразмерного белка MOMP и эпитопов приведены на рис. 3.

Исследуемые белки были сорбированы на планшеты для ИФА. Была проведена оптимизация ИФА для определения антител к *Ch. pneumoniae* в сыворотке крови. Варьировали следующие параметры: разведение растворов рекомбинантных эпитопов при сорбции (от 1:100 до 1:500; 40–200 нМ), разведение анализируемых сывороток,

разведение конъюгата антивидовых антител с пероксидазой. В конечной схеме анализа белки сорбировались в разведениях 1/100 (E, F) и 1/500 (MOMP, D14).

С помощью оптимизированной схемы ИФА (на рекомбинантных антигенах) был проведен анализ сывороток крови пациентов, результаты которого сравнивали с результатами параллельного исследования тех же образцов коммерческими наборами фирмы "Savyon". Наилучшая корреляция с данными

Таблица 1

Определение титра антител класса IgM к *Ch. pneumoniae* для донорских сывороток (приведены значения ОП)

№ сыворотки	MOMP	D14	№ сыворотки
1+	0,567	0,232	1
2	0,303	0,126	2
3	0,28	0,144	3
4	0,377	0,18	4
5	0,42	0,224	5
6	0,288	0,137	6
7	0,338	0,175	7
8	0,444	0,305	8+
9	0,458	0,293	9+
10+	0,555	0,171	10
11	0,41	0,222	11
16+	0,72	0,278	16+/-
17+	0,581	0,195	17
18	0,215	0,134	18
19	0,234	0,147	19
20	0,422	0,146	20
21	0,435	0,17	21
36	0,245	0,196	36
37	0,295	0,134	37
Положительный контроль	1,248	0,618	к+
Отрицательный контроль	0,232	0,136	к-

Примечание. Пороговое значение для MOMP — 0,46; для D14 — 0,27.

ми коммерческих наборов имеет ИФА на основе полноразмерного белка МОМР и в меньшей степени — на основе эпитопа D14. Эпитопы Е и F не обладали антигенностью к используемым положительным стандартным сывороткам (К+) из коммерческого набора, поэтому в дальнейшем не использовались.

IgM-антитела к *Ch.pneumoniae* были измерены с помощью разработанного ИФА, где в качестве антигенов использовали рекомбинантный белок МОМР и эпитоп D14. Были определены титры IgM в 19 сыворотках, предположительно, здоровых доноров (Московская областная станция переливания крови). В качестве отрицательного и положительного контролей использовали соответствующие контроли, входящие в коммерческий набор фирмы "Savyon". Как видно из табл. 1, при использовании МОМР в качестве антигена в 4 случаях мы имеем превышение титра IgM-антител; при использовании D14 — таких сывороток две. При этом за пороговое принимали значение оптической плотности (ОП), в 2 раза превышающее таковое для отрицательной контрольной сыворотки. Обращает на себя внимание тот факт, что конкретные сыворотки, показывающие превышение титра в каждом случае ("Savyon", МОМР, D14) разные, за исключением сыворотки № 16 с повышенным титром во всех трех вариантах ИФА.

Также следует отметить, что разница между значениями ОП для отрицательного и положительного стандартов в случае МОМР значительно выше (0,23 и 1,25) по сравнению с D14 (соответственно 0,14 и 0,62). Это может быть связано с большей репрезентативностью доступных для взаимодействия с антителами хламидийных эпитопов при использовании рекомбинантного МОМР по сравнению с D14. Также необходимо отметить, что величину (cutoff), пороговое значение ($2 \times \text{ОПк-}$) вычисляли в соответствии с инструкцией производителя коммерческого набора, где в качестве антигена используются полные элементарные тельца (ЕВ) *Ch.pneumoniae* с гораздо большим количеством потенциальных антигенов, вызывающих гуморальную реакцию. В целом полученные данные скорее всего соответствуют действительности, так как повышенный титр антител класса IgM к *Ch.pneumoniae* свидетельствует об острой фазе развития инфекции и представляется маловероятным высокий процент таковых среди доноров. Установление диагностически значимого уровня титра IgM-антител к *Ch.pneumoniae* при использовании рекомбинантных антигенов (в частности, МОМР и D14) требует проведения репрезентативных сравнительных статистических исследований (ИФА, ПЦР, клинический диагноз) среди здоровых доноров разных возрастных групп и полов.

В рамках настоящего исследования нами были проанализированы сыворотки пациентов с высоким титром IgM-антител к *Ch.pneumoniae* по данным ИФА ("Savyon"), а также с установленным диагнозом острой бронхолегочной инфекции. Эти сыворотки отличались высоким титром IgM-антител, измеренным коммерческим ("Savyon") ИФА (табл. 2). В качестве отрицательного и положительного контролей использовали соответствующие контроли, входящие в коммерческий набор фирмы

"Savyon". В исследование была также включена сыворотка (561.2) с нормальным титром IgM. В результате сходные данные были получены в случае использования как рекомбинантного МОМР, так и отдельно эпитопа D14; из 6 измеренных сывороток только в 1 случае наблюдалось значительное превышение диагностически значимого уровня. Следует отметить, что эта сыворотка (144.1; см. табл. 2) имела максимальный титр при определении коммерческим ИФА ("Savyon"). При этом максимальная оптическая наблюдаемая плотность в случае МОМР была в 2 раза выше, чем в случае D14. Это может быть связано с наличием дополнительных антигенных детерминант у МОМР (как линейных, так и пространственных); возможно, частично восстановленных в процессе фолдинга рекомбинантного МОМР in vitro.

С помощью оптимизированной схемы ИФА был проведен сравнительный анализ 21 сыворотки крови пациентов из Российского кардиологического научно-производственного комплекса Минздрава со сравнением РФ с параллельным исследованием тех же образцов коммерческими наборами фирмы "Savyon". Определяли наличие антител IgG и IgA. Было обнаружено, что ИФА как на основе полноразмерного белка МОМР, так и на основе эпитопа D14 дает близкие результаты по сравнению с наборами, не позволяющими выявить к недовывающему по сравнению с наборами формы "Savyon" (рис. 4, а, б). При этом при определении как IgG-антител, так и IgA-антител присутствуют сыворотки, показывающие отрицательные значения по "Savyon" и положительные по МОМР/D14.

Было также проведено сравнение с данными по перекрестной реактивности использованных сывороток на наличие антител к *Ch.trachomatis*, которое показало, что разрабатываемый метод не позволяет провести различие между антителами на *Ch.trachomatis* и *Ch.pneumoniae*.

Таблица 2
Титрование сывороток с высоким значением IgM (по "Savyon")

	к-	к+	Данные для МОМР				
			335.1	508.2	586.2	561.2	144.1
1:1	0,471	1,771	0,426	0,423	0,322	0,6	1,845
1:2	0,065	0,973	0,164	0,146	0,111	0,24	1,239
1:4	0,037	0,471	0,068	0,061	0,059	0,113	0,73
1:8	0,019	0,232	0,037	0,031	0,042	0,1	0,444
1:16	0,034	0,112	0,012	0,019	0,04	0,033	0,227
1:32	0,012	0,049	0,013	0,014	0,023	0,028	0,0126
1:64	0,018	0,044	0,028	0,016	0,012	0,016	0,064
1:128	0,023	0,037	0,024	0,03	0,033	0,027	0,033
	к-	к+	Данные для D14				
			335.1	508.2	586.2	561.2	144.1
1:1	0,162	0,881	0,138	0,186	0,0216	0,335	0,785
1:2	0,047	0,401	0,068	0,06	0,087	0,137	0,399
1:4	0,016	0,176	0,036	0,03	0,038	0,06	0,22
1:8	0,25	0,117	0,039	0,038	0,05	0,055	0,118
1:16	0,021	0,048	0,015	0,021	0,039	0,032	0,067
1:32	0,02	0,025	0,012	0,019	0,014	0,029	0,06
1:64	0,041	0,038	0,025	0,018	0,027	0,028	0,031
1:128	0,023	0,031	0,02	0,013	0,024	0,02	0,024

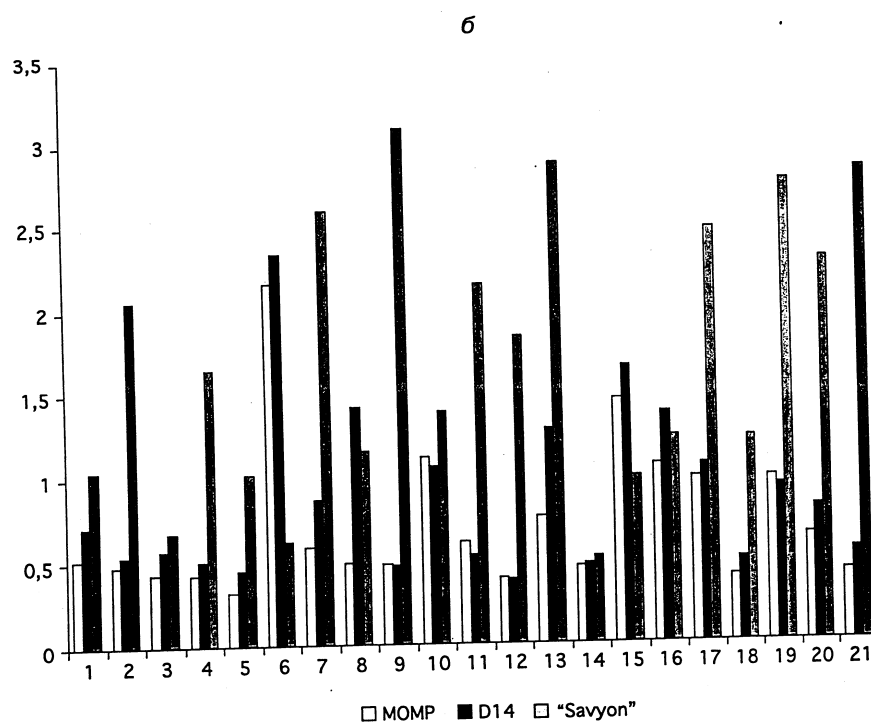
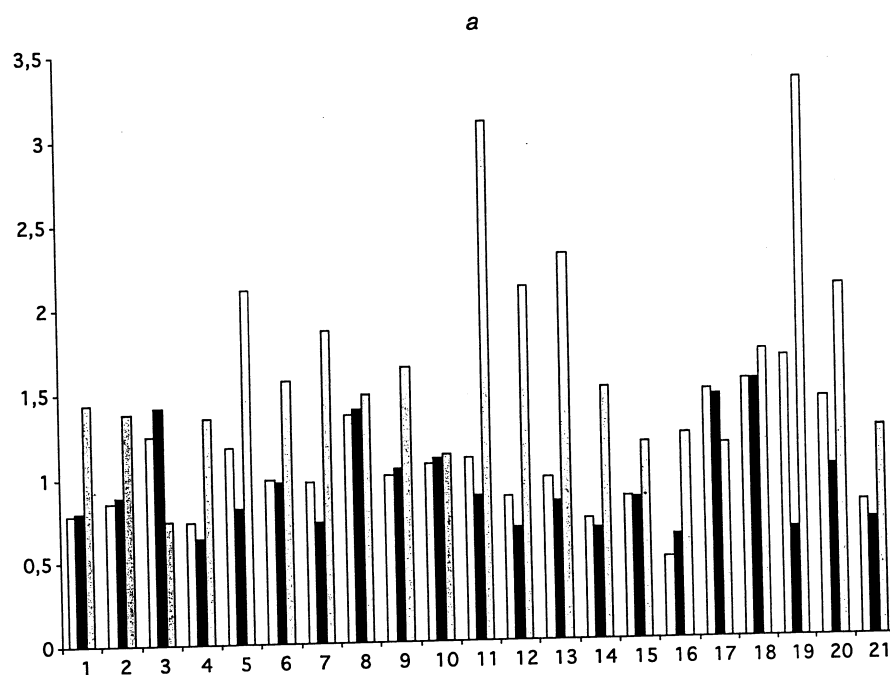


Рис. 4. Сравнительный анализ сывороток крови пациентов на наличие антител класса IgG (a) и IgA (б) определенных методом ИФА с использованием в качестве антигена рекомбинантных MOMP и D14-эпитопа, а также коммерческим набором фирмы "Savyon".
По оси абсцисс — номера сывороток, по оси ординат — ОП нормированные значения. Светлый столбик — MOMP, темный — D14, со штриховкой — "Savyon".

Для предсказания пространственной структуры МОМР была использована программа THREADER 3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk>), так как стандартный подход моделирования по гомологии в данном случае неприменим из-за низкой гомологии (< 30%) с известными структурами. Суть метода заключается в "протяжке" первичной структуры целевого белка через базу данных известных типов укладок (около 6 тыс. различных типов) с последующей минимизацией по энергии. Наиболее близкий структурный аналог — 1tbg (классификация PDB) представляет собой BETA-GAMMA DIMER OF THE HETEROTRIMERIC G-PROTEIN TRANSDUCIN.

Ch. pneumoniae относится к грамотрицательным микроорганизмам, у которых пептидогликаны образуют внешний каркас. В случае Ch. pneumoniae пептидогликаны не были обнаружены во внешней мембране [12]. Для объяснения этого феномена было предложено, что МОМР наряду с белками 60 и 12 кД (cysteine-rich) образует надмолекулярную структуру, стабилизируемую дисульфидными связями и, таким образом, отвечающую за целостность внешней мембраны. Такая надмолекулярная структура должна обладать достаточной пластичностью, чтобы обеспечивать структурные изменения, происходящие при изменении конформации от EB (elementary bodies) размером около 300 нм до метаболически активных RB (reticulate bodies) размером до 1500 нм [22, 23].

Таким образом, в процессе работы получен штамм E. coli — продуцент рекомбинантного белка МОМР Ch. pneumoniae, а также определенных фрагментов данного белка, предположительно, обладающих антигенными свойствами (эпитопов). Разработана и оптимизирована технология выделения и очистки указанных выше рекомбинантных белков с использованием металлохелатной аффинной хроматографии.

Диагностика Ch. pneumoniae путем определения специфических антител в сыворотке крови является чрезвычайно актуальной задачей. В качестве основных мишеней для гуморального иммунного ответа человека принято считать части хламидийного внешнемембранного комплекса, куда входит основной белок (МОМР). Также из литературы известно, что МОМР Ch. pneumoniae в отличие от Ch. trachomatis не является иммунодоминантным. Нами методом ИФА было изучено распределение специфических к Ch. pneumoniae антител класса IgM на основе рекомбинантного МОМР и его эпитопов (D, E, F). Проведенный сравнительный анализ образцов сывороток крови пациентов, в котором определяли титр специфических к Ch. pneumoniae антител в сравнении с коммерческим набором фирмы "Savyon", показал недоявление положительных сывороток нашим ИФА-тестом. Это может быть объяснено тем, что лишь часть вырабатываемых антител является специфичной к конформационным эпитопам МОМР, которые не сохраняются в рекомбинантном препарате, тогда как другие антитела, специфичны к иным хламидийным антигенным детерминантам. Несмотря на интенсивные исследования, направленные на изучение антигенного состава Ch. pneumoniae, иммунодоминантный видоспеци-

фический эпитоп не был найден (в отличие от иммунодоминантного МОМР Ch. trachomatis). Перспективным представляется подход, основанный на комбинированном использовании различных иммуногенных рекомбинантных белков Ch. pneumoniae в диапазоне 15–99 кД, дающих сигнал в иммуноблот-анализе. Такие исследования имеют потенциальное значение как для разработки вакцин, так и для диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Манзенюк И. Н., Воробьева М. С. C. pneumoniae, современное представление о возбудителе, клиника, диагностика, лечение: Брошюра. — Новосибирск, 2002.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М., 1982.
3. Bavoil P., Ohlin A., Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in Chlamydia trachomatis // Infect. and Immun. — 1984. — Vol. 44. — P. 479–482.
4. Boman J., Gaydos C. A., Quinn T. C. Molecular diagnosis of Chlamydia pneumoniae infection // J. Clin. Microbiol. — 1995. — Vol. 37. — P. 3791–3799.
5. Campbell L. A., Kuo C. C., Grayston J. T. Structural and antigenic analysis of Chlamydia pneumoniae // Infect. and Immun. — 1990. — Vol. 58. — P. 93–97.
6. Combet C., Blanchet C., Geourjon C., Deleage G. Network protein sequence analysis // TIBS. — 2000. — Vol. 25, N 3. — P. 147–150.
7. Danesh J., Collins R., Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? // Lancet. — 1997. — Vol. 350. — P. 430–436.
8. Essig A., Simnacher U., Susa M., Marre R. Analysis of the humoral immune response to Chlamydia pneumoniae by immunoblotting and immunoprecipitation // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 1999. — Vol. 6. — P. 819–825.
9. Gabriel A. S., Gnarp H., Hallander H. et al. The prevalence of chronic Chlamydia pneumoniae infection detected by polymerase chain reaction in pharyngeal samples from patients with ischaemic heart disease // Eur. Heart J. — 1998. — Vol. 19. — P. 1321–1327.
10. Grayston J. T., Campbell L. A., Mordhorst C. H. et al. A new respiratory pathogen: Chlamydia pneumoniae strain (TWAR) // J. Infect. Dis. — 1989. — Vol. 161. — P. 618–625.
11. Hanahan D. Studies of transformation of Escherichia coli with plasmids // J. Mol. Biol. — 1983. — Vol. 166. — P. 557–580.
12. Hatch T. P. Disulfide cross-linked envelope proteins: The functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? // J. Bacteriol. — 1996. — Vol. 78. — P. 1–5.
13. Kauppinen M., Saikku P. Pneumonia due to Chlamydia pneumoniae: prevalence, clinical features, diagnosis and treatment // Clin. Infect. Dis. — 1995. — Vol. 21. — P. 244–252.
14. Kido Y., Shirai M., Ouchi K., Nakazawa T. Analysis of the serological response to Chlamydia pneumoniae in patients with ischemic heart disease by recombinant MOMP-ELISA // J. Infect. Chemother. — 2001. — Vol. 7, N 3. — P. 180–185.
15. Klein M., Kotz A., Bernardo K., Kronke M. Detection of Chlamydia pneumoniae — specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41, N 5. — P. 1957–1962.
16. Kuo C. C., Jackson L. A., Grayston J. T. Chlamydia pneumoniae (TWAR) // Clin. Microbiol. Rev. — 1995. — Vol. 8. — P. 451–461.
17. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
18. Laurilla A., Bloigu A., Nayha S. et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1997. — Vol. 350. — P. 2910–2913.
19. Rodriguez-Maranon M. J., Bush R. M., Peterson E. M. et al. Prediction of the membrane-spanning beta-strands of the major outer membrane protein of Chlamydia // Protein Sci. — 2002. — Vol. 11, N 7. — P. 1854–1861.
20. Saikku P. Epidemiology of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis // Am. Heart J. — 1999. — Vol. 138, N 5, Pt 2. — P. 500–503.
21. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 5463–5467.

22. Thom D. H., Grayston J. T., Siskovick D. S. et al. Association of prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease // *J. A. M. A.* — 1992. — Vol. 268, N 1. — P. 68—72.
23. Wolf K., Fischer E., Mead D. et al. *Chlamydia pneumoniae* major outer membrane protein is a surface-exposed antigen that elicits

antibodies primarily directed against conformation-dependent determinants // *Infect. and Immun.* — 2001. — Vol. 69. — P. 3082—3091.

Поступила 01.03.06

ИММУНОПАТОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 615.276.2/4.03:615.91.099.036.11.076.9

П. Ф. Забродский, В. Г. Германчук, В. Г. Мандыч

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПОЛИОКСИДОНИЯ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ТОКСИЧНЫМИ ХИМИКАТАМИ ИПРИТОМ И ЛЮИЗИТОМ

Саратовский военный институт радиационной, химической и биологической защиты

В экспериментах на неинбредных крысах установлено, что при остром отравлении токсичными химикатами люизитом и ипритом (0,5 LD₅₀) введение полиоксидония в дозе 100 мкг/кг в течение 4 сут (ежедневно, однократно) частично восстанавливает вызванную ими супрессию показателей системы иммунитета и снижает индуцированное токсикантами перекисное окисление липидов.

During experiment noninbred rats were exposed to the acute intoxication of toxic chemicals (sulphur mustard, lewisite) at a dose 0,5 LD₅₀. Then Polyoxidonium was injected to them daily at a dose of 100 mkg/kg in 4 days (single dose). It was found that suppression provoked by the toxic chemicals partly reduced rats' immune system parameters and induced peroxide oxidizing of lipids.

Токсичные химикаты (ТХ) — иприт, люизит, вещество VX, зарин — являются основными элементами химического оружия (ХО) и подлежат уничтожению согласно международным соглашениям на специальных промышленных объектах [3, 8]. Не исключены возможность аварий на данных объектах, а также массовые поражения людей при транспортировке и хранении ТХ. Позитивные шаги международного сообщества, в том числе и России, в области ликвидации и полного запрета ХО не уменьшили реальность его использования в террористических и криминальных целях [4, 8, 14]. Кроме того, существует возможность возникновения аварийных ситуаций в процессе уничтожения ХО, которые могут сопровождаться выбросом в окружающую среду ТХ или продуктов их деструкции и приводить к поражению персонала объектов уничтожения ХО или населения прилегающих территорий [8]. Кроме того, до сих пор не исключено использование ТХ в локальных вооруженных конфликтах [13, 14]. Иприт и люизит — ТХ кожно-нарывного действия (везиканты) [13]; их запасы, подлежащие уничтожению, значительно превышают запасы других отравляющих веществ (ОВ). Из ТХ кожно-нарывного действия иприт широко применялся в период Первой мировой войны и 10 локальных вооруженных конфликтов XX столетия [14], в частности в ирано-иракском конфликте [12]. В настоящее время за рубежом активно ведутся разработки и поиск высокоэффективных терапевтических (антидотных) средств при поражении ТХ [10], исследуются биомаркеры для дифференциальной диагностики между поражением кожи ип-

ритом или люизитом [11], изучаются отдаленные эффекты поражения ипритом [14].

Острые отравления ТХ кожно-нарывного действия могут сопровождаться инфекционными осложнениями и заболеваниями, связанными со снижением показателей иммунного статуса [5]. Антиоксидантные, иммуностимулирующие, детоксикационные, мембраностабилизирующие свойства полиоксидония (ПО) [9] позволяют предполагать возможность снижения при его применении поражения системы иммунитета различными токсикантами, которые могут приводить к формированию вторичных иммунодефицитных состояний [4], в частности ТХ ипритом и люизитом.

Целью исследования являлась оценка иммуностимулирующих свойств ПО при остром отравлении ТХ, относящимися к ОВ кожно-нарывного действия, ипритом (β, β'-дихлордиэтилсульфидом; 2, 2'-дихлордиэтилсульфидом) и люизитом (β-хлорвинилдихлорарсином, 2-хлорэтилдихлорарсином).

Методика исследований. Эксперименты проводили на беспородных крысах обоего пола массой 180—240 г. ТХ вводили подкожно в дозе 0,5 LD₅₀ (LD₅₀ иприта и люизита при подкожном введении в растворе диметилсульфоксида составляли соответственно 5,5 ± 0,3 и 2,8 ± 0,3 мг/кг). ПО вводили внутримышечно в течение 4 сут в дозе 100 мкг/кг после применения ТХ ежедневно, однократно. Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами экспериментальной иммунологии и иммунотоксикологии [6]. Гуморальный иммунный ответ к тимусзависимому (эритроцитам барана — ЭБ) и тимуснезависимому (брюшно-тифозному Vi-антигену — Vi-Ag) антигенам оценивали через 5 сут по числу АОК в селезенке после введения ТХ с одновременной внутрибрюшинной иммунизацией крыс данными антигенами в дозах 2 · 10⁸ клеток и 8 мкг/кг соответственно. Данные тесты характеризуют синтез IgM В-клетками