

УДК 616.983

## ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХЛАМИДИОЗЕ

Д.Ф. ХВОРИК, к.м.н., доцент; В.М. Цыркунов, д.м.н., профессор;  
Д.Е. Конкин

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Полученные в ходе эксперимента данные об интравагинальном введении штамма *S. trachomatis* MT-2A (серо-вар D) свидетельствуют о высокой иммуногенности данного штамма, развитии хламидийной инфекции у мышей, что может быть использовано в качестве модели хламидийной инфекции для изучения закономерностей патогенеза.*

**Ключевые слова:** хламидийная инфекция, *Chlamydia trachomatis*, мыши, полиоксидоний.

*The experimental data received at intravaginal introduction of serovar D (MT-2A) *Chlamydia trachomatis* to laboratory mice testify to its high immunogenicity that can be used as a model of *Chlamydia* infection for studying the laws of pathogenesis.*

**Key words:** *chlamydia infection, Chlamydia trachomatis, mice, polyoxidonium.*

Хламидийная инфекция (ХИ) является наиболее частой инфекцией, передаваемой половым путем (ИППП) [1, 5, 10]. Ежегодно в мире регистрируется 90 миллионов новых случаев заражения хламидиозом [1,5]. Выраженный полиморфизм клинических проявлений и отсутствие патогномичных симптомов значительно осложняет клиническую диагностику хламидиозов [10]. По данным ВОЗ, хламидиозом инфицировано до 50% мужчин и до 60% женщин с воспалительными заболеваниями органов мочеполовой, костно-суставной, ретикулярно-эндотелиальной и других систем.

Решением одной из проблемных задач, связанных с хроническим урогенитальным хламидиозом (ХУГХ), может быть применение специфической (направленной) иммунотерапии в виде антихламидийной вакцины, разработанной для интравагинального применения [8]. Целесообразность и этио- патогенетическое обоснование такого вида терапии очевидно и определяется следующими положениями, характеризующими ХУГХ: наличие хронической инфекции с длительным внутриклеточным персистированием *S. trachomatis* в урогенитальном тракте женщин; неполноценность факторов специфического иммунного ответа (местных, общих), обеспечивающих элиминацию возбудителя; повышенный синтез белка теплового шока (HSP60), приводящий к дефициту Th1, снижение выработки интерферона-гамма и переключению иммунного ответа с Th1 на Th2 тип иммунного ответа [7, 8]; повышенная выработка цитокинов Th2-хелперного ответа – интерлейкинов 6 и 10 [3, 7, 8]; полирезистентность *S. trachomatis* к антибиотикам [2, 4].

Последние испытания на животных показали, что аттенуированные и убитые вакцины способны стимулировать мукозный и клеточный иммунитет, что открывает перспективы для их использования не только в ветеринарии, но и в здравоохранении с

лечебной и профилактической целью. Особенно перспективно создание такой вакцины для лечения больных с персистентными формами инфекции, хламидия индуцированными артропатиями, бронхолегочной патологией. Как правило, у таких больных иммунитет «молчит» и продукция антител классов IgA, IgM, IgG в диагностических титрах часто отсутствует. Преимущество комплексной инактивированной вакцины заключается в том, что антитела вырабатываются не к одному, а ко всем поверхностным антигенам MOMP (Major Outer Membrane Protein), OMP (Outer Membrane Protein), LPS (Lipopolisaccharid), что позволит стимулировать иммунную систему в целом [11, 12].

Практика показывает, что инактивированные вакцины, содержащие в своем составе различные стимуляторы, способны эффективно защищать против вирусных и бактериальных инфекций, например, полиомиелита и гриппа, холеры, коклюша, дизентерии [9]. Большие надежды исследователя связывают с использованием в качестве адьюванта иммуностимулятора последнего поколения – полиоксидония (ПО). ПО – это высокомолекулярное физиологически активное соединение, являющееся N-оксидированным производным полиэтиленпиперазина, повышающее функциональную активность практически всех звеньев защиты организма от инфекции [7].

В связи с этим, конечные усилия по созданию хламидийной вакцины должны заключаться в разработке приемлемых иммунизационных режимов, способных индуцировать и сохранять продолжительный протективный иммунитет в мукозальных сайтах *S. trachomatis*.

Цель исследования – оценить иммунный ответ у мышей с экспериментальной хламидийной инфекцией при интравагинальном введении антигенного препарата по лечебной схеме.

### Материал и методы

Для моделирования хламидийной инфекции использован авторский высокоиммуногенный штамм *C. trachomatis* МТ-2А, выделенный из эпителия уретры больного с ХУГХ. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) установлено, что штамм *C. trachomatis* МТ-2А содержал фрагменты генов 16S рРНК, являющиеся консервативными для данного вида возбудителя и определяющие его патогенность и вирулентность. Концентрация ДНК при титре возбудителя  $5 \times 10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/мл составляла  $1,7 \times 10^6$  копий/мл. Секвенирование гена *omp1*, кодирующего МOMP белок, показало, что штамм *C. trachomatis* МТ-2А соответствовал серовару D и на 95% был гомологичен стандартному штамму D/B185 (X62919) [2, 4, 6].

В экспериментах использовали 17 самок мышей BALB/c 5-6 недельного возраста массой 15-20 г. Мышей заражали *C. trachomatis* в объеме 30 мкл (титр  $5 \times 10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/мл). Было сформировано 2 группы животных: I – опытная (11 мышей), в которую вошли мыши, получающие хламидийный антиген с ПО по лечебной схеме (нулевая точка – начало опыта) и II – контрольная (6 мышей). Перед проведением опыта мышей содержали на карантине в течение 2 недель. Животные I группы были инфицированы штаммом *C. trachomatis* МТ-2А (доза  $5 \times 10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/мл) внутривагинально в объеме 30 мкл, животные II группы получали аналогичные инъекции ФСБ (фосфатно-солевого буфера). Развитие инфекции контролировали исследованием смывов из вагины мышей в РИФ. Накопление антител в сыворотках крови (IgG, IgM) и смывах из вагины (sIgA) исследовали в ИФА каждые 7 дней в течение 49 дней.

Ведение хламидийного антигенного препарата мышам опытной группе начали через 30 дней после начала опыта. Антиген с полиоксидонием вводили интравагинально, 7 раз, ежедневно. Через 12 дней после лечения (через 49 суток после начала опыта) проводили реинфицирование в обеих группах. Мышей реинфицировали *C. trachomatis* в объеме 30 мкл (титр  $5 \times 10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/мл). Наличие инфекции регистрировали культуральным методом, инфицированные культуры – окрашиванием по Романовскому-Гимзе через 72 ч. и в РИФ.

Возбудитель *C. trachomatis*, штамм МТ-2А (серовар D) накапливали в культуре клеток McCoу. Максимальных титров ( $5 \times 10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/мл) возбудитель достигал через 72 ч культивирования. Электронно-микроскопический анализ показал, что при репродукции штамм *C. trachomatis* МТ-2А сохра-

нял относительно невысокий уровень цитодеструктивного действия. При анализе ультратонких срезов клеток McCoу, инфицированных штаммом *C. trachomatis* МТ-2А, выявлялись внутрицитоплазматические репликативные комплексы, содержащие хламидийные тельца на разных стадиях развития: элементарные (ЭТ), ретикулярные (РТ) и промежуточные (ПТ). Установлено, что при пассировании штамм не изменил свою ультраструктуру, сохранил целостность клеточной стенки и все этапы морфогенеза – от РТ до ЭТ.

### Результаты и обсуждение

Клинические наблюдения проводили в одно и то же время суток. Они включали: контроль веса, поведения и внешнего вида мышей (состояние конъюнктивы глаз, шерстного покрова). У мышей развивалась характерная клиническая картина заболевания, доказательством чего стало выделение возбудителя в смывах из вагины и наличие соответствующих классов антител к *C. trachomatis* в сыворотке крови. У животных I группы отмечено изменение шерстного покрова (разрежение, потемнение шерсти). Пик очагового выпадения шерсти (на лобной части головы, боках, спине), снижение двигательной активности, незначительное уменьшение массы тела отмечены на 13-15 сутки. К 49 суткам наступало постепенное восстановление шерстного покрова. Подобных изменений не было зарегистрировано в контрольной (II) группе. Гибели животных не отмечалось ни в одной из групп.

Верификация инфекционного процесса, возникшего после инфицирования животных культурой *C. trachomatis* у животных 1 и 2 групп, была проведена различными методами, включая выявление возбудителя в вагинальных смывах после внутривагинального заражения животных путем заражения культур клеток McCoу десятикратными разведениями смывов. Результаты наличия продуктивной инфекции фиксировали через 72 ч окрашиванием по Романовскому Гимзе и в РИФ.

Результаты исследований в опытной группе (моделирование хламидийной инфекции). В табл. 1 представлены результаты выявления *C. trachomatis* в культуре клеток в динамике эксперимента в опытной группе, получавшей после инфицирования (моделирования ХУГХ) с лечебной целью выделенный антиген и ПО.

Как видно из табл. 1, в динамике происходило постепенное снижение титра возбудителя *C. trachomatis*, а к 28 дню наблюдения достигнута его полная элиминация. После проведения реинфицирования (49 день опыта) отмечено повторное

**Таблица 1** – Концентрация *C. trachomatis* в культуре клеток McCoу в опытной группе животных в динамике моделирования внутривагинальной хламидийной инфекции (титры ТЦД<sub>50</sub>/мл)

День опыта	0	7	14	21	28	31-37	38-48	49	56	63	70	77	84	91	98
Конц. <i>C. trachomatis</i>		$5,5 \times 10^4$	$4,6 \times 10^3$	$2,8 \times 10^1$	0				$2,62 \times 10^4$	$3,25 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$	0	0	0

Примечание: 0 – инфицирование, 31-37 – период введения антигена и ПО; 38-48 дни после лечения; 49 – день реинфицирования.

выделение *C. trachomatis*, которое прекратилось к 84 дню.

Контролем динамики инфекционного процесса стали показатели специфических антител (IgM IgG) в сыворотке крови и секреторного (sIgG), определяемого в вагинальных смывах инфицированных животных (табл. 2, 3, 4).

Как видно из табл. 2, динамика острофазовых иммуноглобулинов (IgM) в полной мере повторяла динамику выделенных в культуре клеток возбудителей. Первые признаки специфического иммунного ответа были зафиксированы на 7 день, максимальные титры антител – на 14 день, затем произошло быстрое их снижение, и к 35 дню данный класс антител, характеризующих острую фазу инфекционного процесса, не определялся. Обращало на себя внимание то, что реинфицирование не вызвало столь заметного, особенно по продолжительности иммунного ответа, данный класс антител быстро исчез спустя 2 недели после реинфекции.

Значительный интерес имели данные по динамике иммуноглобулинов «памяти», к которым относятся IgG (табл. 3).

Как видно из табл. 3, со 2 недели инфицирования начался рост данного класса антител, который продолжался весь период наблюдения, причем значительный подъем антител произошел спустя 1 неделю после инфицирования. Максимальный «кумулятивный» эффект накопления IgG, зафиксированный спустя 2 недели после инфицирования, совпал с исчезновением из крови IgM (табл. 2) и сохранился на высоких показателях в течение всего 98 дневного наблюдения за животными (табл. 4).

Как видно из табл. 4, содержание секреторных иммуноглобулинов, свидетельствующих об специфическом местном иммунном ответе, напоминало динамику сывороточных антител класса G. Установлено, что их появление на 2 неделе сохранялось весь период наблюдения и максимальная концент-

рация достигала после реинфицирования.

Таким образом, результаты, представленные в табл. 1-4, убедительно свидетельствовали о развитии инфекционного процесса у экспериментальных животных, инфицированных *C. trachomatis* МТ-2А, наличии характерной динамики со стороны иммунологических показателей, отражающих специфичность зарегистрированного иммунного ответа, что подтверждало адекватность выбранной модели, рекомендуемой для изучения отдельных сторон патогенеза хламидийной инфекции.

Результаты исследований в опытной группе (эффективность интавагинального введения хламидийного антигена). Лечение начали через 30 дней после начала опыта. Мышам вводили хламидийный антиген с ПО интравагинально, 7 раз, ежедневно. Через 12 дней после лечения (через 49 суток после начала опыта) проводили реинфицирование в обеих группах. Мышей заражали *C. trachomatis* в объеме 30 мкл (титр  $5 \times 10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/мл). Наличие инфекции фиксировали через 72 ч в РИФ. Наличие антител проводили через каждые 7 дней в течение 49 дней (табл. 5).

Как видно из табл. 5, средние показатели содержания *C. trachomatis* в культуре клеток McCoy в опытной группе были такие же, как в аналогичной без применения специфической терапии. Элиминация возбудителя происходила к 28 дню наблюдения. В дальнейшем, сравнительный анализ выявил различия. В группе животных, получавших хламидийный антиген и ПО, выделение возбудителя зафиксировано лишь на 56 день наблюдения, далее культуральный метод дал отрицательные результаты. Таким образом, прекращение выделения *C. trachomatis* в данной группе было достигнуто на 32 дня раньше, чем в группе животных, не получавших комбинированной терапии.

Содержание IgG к *C. trachomatis* в сыворотке крови опытной группы экспериментальных животных в динамике интравагинального введения ан-

**Таблица 2** – Содержание IgM к *C. trachomatis* в сыворотке крови опытной группы животных в динамике моделирования внутривагинальной хламидийной инфекции (сред. величины)

День опыта	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98
IgM	0	133± 34,4	212± 56,0	65± 17,5	1± 0,01	0	0	0	116± 15,1	26± 7,8	0	0	0	0	0

Примечание: 49 – день реинфицирования.

**Таблица 3** – Содержание IgG к *C. trachomatis* в сыворотке крови опытной группы экспериментальных животных в динамике моделирования внутривагинальной хламидийной инфекции (сред. величины)

День опыта	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98
IgG	0	5± 1,7	24.0± 12,8	85.0± 27,5	163.0 ±46,5	370.0 ±79,0	580.0 ±138,1	430.0 ±87,0	980.0 ±180,0	1040.0 ±160,0	880± 130,0	860± 140,0	920± 120,0	880± 130,6	860± 140,0

Примечание: 49 – день реинфицирования.

**Таблица 4** – Содержание sIgA в вагинальных смывах опытной группы экспериментальных животных в динамике моделирования внутривагинальной хламидийной инфекции в (сред. величины)

День опыта	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98
sIgA	0	5	32± 8,9	100± 29,2	92± 28,5	96± 14,9	92± 28,5	90± 16,7	134± 34,0	114± 28,3	92± 16,7	94± 15,8	92± 19,6	91± 20,0	87± 20,7

Примечание: 49 – день реинфицирования.

**Таблица 5** – Концентрация *C. trachomatis* в культуре клеток McCoу в опытной группе животных в динамике интравагинального введения антигенного препарата (титры ТЦД<sub>50</sub>/мл)

День опыта	0	7	14	21	28	31-37	38-48, 49	56	63	70	77	84	91	98
Конц. <i>C. trachomatis</i>		5,4x 10 <sup>4</sup>	5,5x 10 <sup>3</sup>	3,6x 10 <sup>1</sup>	0			1,32x 10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0

Примечание: 31-37 – период введения антигена и полиоксидония; 38-48 дни после лечения; 49 – день реинфицирования.

**Таблица 6** – Содержание IgG к *C. trachomatis* в сыворотке крови опытной группы экспериментальных животных в динамике интравагинального введения антигенного препарата (сред. величины)

День опыта	0	7	14	21	28	31-37	38-48, 49	56	63	70	77	84	91	98
IgG	0	17± 9,3	36± 14,0	94,0± 26,3	133,0± 38,5		1120± 265,3	1840± 316,7	2000± 342,5	1920± 297	1880± 315,8	1840± 240	1760± 261,3	1840± 240,0

Примечание: 31-37 – период введения антигена и ПО; 38-48 дни после лечения; 49 – день реинфицирования; с 29-48 день кровь не исследовалась.

**Таблица 7** – Содержание sIgA в вагинальных смывах опытной группы экспериментальных животных в динамике интавагинального введения антигенного препарата (сред. величины)

День опыта	0	7	14	21	28	31-37	38-48, 49	56	63	70	77	84	91	98
sIgA	0	7± 1,5	36± 8,2	92± 15,8	88± 28,9		172± 34,8	178± 62,0	164± 36,0	156± 30,7	148± 23,9	136± 35,3	146± 34,0	172± 34,8

Примечание: 31-37 – период введения антигена и полиоксидония; 38-48 дни после лечения; 49 – день реинфицирования; с 29-48 день кровь не исследовалась.

тигенного препарата представлено в табл. 6.

Как видно из табл. 6, накопление титров антител в первый период наблюдения (до применения антигенного препарата) происходило аналогично динамике титров в группе без лечения (табл. 3). После введения антигенного препарата в крови животных резко происходило увеличение соответствующего класса антител, уровень которых достоверно превышал сравниваемые показатели. Обращало на себя внимание, что показатели IgG в течение всего периода наблюдения сохранялись на высоком уровне, даже без тенденции к снижению, в 3 раза превышающие сравниваемые показатели.

Содержание sIgA в вагинальных смывах опытной группы экспериментальных животных в динамике интавагинального введения антигенного препарата представлено в табл. 7.

Как видно из табл. 7, начиная с 49 дня наблюдения происходило значительное увеличение количества секреторных иммуноглобулинов, свидетельствующее об активации гуморального иммунитета у животных на введение антихламидийного антигена в сочетании с иммуномодулятором ПО.

### Заключение

Сокращение сроков элиминации возбудителя на 32 дня, увеличение продукции в короткие сроки высоких уровней специфических антител и сохранение их на стабильном уровне длительное время свидетельствуют о наличии положительного лечебного эффекта у применяемых препаратов, относящихся к варианту вакцинальных.

Таким образом, полученные в ходе эксперимента данные об интравагинальном введении штамма *C. trachomatis* МТ-2А (серовар D) свидетельствуют о высокой иммуногенности данного штамма,

развитии хламидийной инфекции у мышей, что может быть использовано в качестве модели хламидийной инфекции для изучения закономерностей патогенеза.

### Литература

1. Аковбян, В.А. Болезни, передаваемые половым путем: уроки прошлого и взгляд в будущее / В.А. Аковбян, В.И. Прохоренков // Вестник дерматологии и венерологии. -1995. – №3. – С.16-19.
2. Антитела к белку теплового шока-60 CHLAMYDIA trachomatis при экспериментальной хламидийной инфекции / Н.Н. Полещук [и др.] // Молекулярная диагностика инфекционных заболеваний: материалы международной научно-практической конференции. – Минск, 2007. – С.71-72.
3. Гомберг, М.А. Обоснование иммунотерапии при лечении рецидивирующего урогенитального хламидиоза / М. А. Гомберг, А. М. Соловьев, А. Д. Черноусов // Инфекции, передаваемые половым путем: Издание Ассоциации по борьбе с заболеваниями, передаваемыми половым путем, САНАМ. – 2000. – №2. – С. 30-35.
4. Костюк, С.А. Совершенствование подходов к лечению пациентов с урогенитальным хламидиозом / С.А. Костюк, Д.Ф. Хворик // Медицинская панорама. -2005. – №9. – С.42-43.
5. Мавров, Г.И. Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика / Г.И. Мавров. – К., 2006. – 542с.
6. Молекулярно-биологические критерии оценки активности инфекционного процесса при хламидийной инфекции / Д.Ф. Хворик [и др.] // Здоровоохранение. – 2008. – №4. – С.64-68.
7. Никитин, А.А. Поиск эффективных модуляторов цитокинпродуцирующей функции макрофагов / А. А. Никитин и [др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины: Ежемесячный международный научно-теоретический журнал РАМН. – 2004. – Том 138, № 9. – С. 293-295.
8. Разработка вакцины против урогенитального хламидиоза: ультраструктурная и молекулярно-биологическая характеристика штамма Chlamydia trachomatis МТ-2А / Н.Н. Полещук [и др.] // Здоровоохранение. – 2005. – № 11. – С. 46–50.
9. Редькин, Ю.В. Полиоксидоний в комплексной терапии больных рецидивирующим генитальным герпесом: клиническая и фармакологическая эффективность / Ю.В. Редькин, А.Ю. Одокиенко // Вестник дерматологии и венерологии. – 2006. – №3. – С.57-62.
10. Семенов, В.М. Хламидийная инфекция / В.М.Семенов. – Витебск, 2005. – 206 с.
11. Antibody response to the 60-kDa chlamydial heat-shock protein is associated with scarring trachoma / R.W. Peeling [et al.] // J. Infect. Dis. -1998. -Vol. 177. -P. 256–259.
12. Chlamydia trachomatis heat shock protein-60 induced interferon-gamma and interleukin-10 production in infertile women / A. Kinnunen [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2003. – Vol. 131. – P. 299–303.

Поступила 10.06.08.