Д. Ф. ХВОРИК, В. М. ЦЫРКУНОВ, Н. Н. ПОЛЕЩУК, С. А. КОСТЮК, Н. Н. КАПИТУЛЕЦ, С. П. КАПИТУЛЕЦ, Л. В. РУБАНИК

ФОРМИРОВАНИЕ ИММУНИТЕТА ПРИ ХЛАМИДИЙНОЙ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Гродненский государственный медицинский университет, НИИ эпидемиологии и микробиологии, Белорусская медицинская академия последипломного образования

В последние годы проблеме хронических урогенитальных хламидиозов (ХУГХ) уделяется пристальное внимание. По данным ВОЗ, хламидиозом поражено до 50% мужчин и до 60% женщин, страдающих воспалительными заболеваниями органов мочеполовой, костно-суставной, ретикулярно-эндотелиальной и других систем. Далеко неполные эпидемиологические и микробиологические сведения о персистенции и активной репродукции возбудителя показали, что в республике у больных с различными клиническими проявлениями (артриты, циститы, уретриты, эндоцервициты и т. д.) хламидиоз отмечается в 45—60% случаев. Осложнения ХУГХ выявляются у 50—80% женщин, страдающих хроническим уретритом, вагинитом, сальпингитом и т. д. [1—3, 6]. Часто патология остается нераспознанной, так как до сих пор недостаточно разработаны методы эффективной терапии первично хронических (персистентных) форм данной инфекции, а способы и средства специфической профилактики урогенитальных хламидиозов, к сожалению, пока отсутствуют [2, 3, 9].

Наиболее приемлемым и эффективным методом управления данной инфекцией является специфическая профилактика заболевания. Создание вакцины против *C. trachomatis* является актуальным направлением научных исследований во всем мире. Почти за 40 лет поиска противохламидийной вакцины цель все еще не достигнута, несмотря на большие усилия, прилагаемые в этом направлении такими крупными компаниями-производителями вакцин, как «Antex», «Aventis-Pasteur», «Corixa». Прогресс в этой области был ограничен недостаточной изученностью механизмов защитного иммунитета и иммунопатологии при хламидиозе. Однако технические и концептуальные успехи последних десятилетий открывают перспективу для создания действенной вакцины против хламидийной инфекции [5].

В настоящее время за рубежом разрабатываются хламидийные ДНК-вакцины, однако следует учитывать, что их разработка и использование являются перспективой, а на практике с успехом используются не ДНК-вакцины, а убитые и аттенуированные противохламидийные вакцины для предотвращения абортов у животных.

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 важно создание такой вакцины для лечения больных с персистентными формами инфекции, хламидиоиндуцированными 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 (Lipopolisacharid), что позволяет стимулировать иммунную систему в целом [7, 9].

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 [1, 4]. Большие надежды исследователи связывают с использованием в качестве адъюванта иммуностимулятора последнего поколения — полиоксидония (ПО). ПО — это высокомолекулярное физиологически активное соединение, являющееся N-оксидированным производным полиэтиленпиперазина. Препарат создан в ГНЦ Института иммунологии Минздрава России Р. В. Петровым, Р. М. Хаитовым, А. В. Некрасовым и др. и рекомендован Фармакологическим комитетом Минздрава России к медицинскому применению (04.07.1996 г., рег. номер 96/302/9) у детей и взрослых в дозе 0,1 мг/кг (3—6—12 мг за прием), 1 раз в сутки в виде 5—10 инъекций, ежедневно или через день, 2 раза или 1 раз в неделю, внутримышечно или подкожно. Препарат производится в лекарственных формах: инъекционной и в виде суппозиториев [1, 4, 7].

ПО является уникальной полимерной молекулой с многогранным положительным воздействием на организм человека (иммуностимулирующий, детоксицирующий, антиоксидантный, мембраностабилизирующий эффекты). Так, иммуностимулирующий эффект связан со способностью ПО активировать клетки моноцитарно-макрофагальной системы. Следствием активации клеток этой системы является повышение функциональной активности практически всех звеньев защиты организма от инфекции, в частности:

- факторов естественной резистентности: нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, NK-клеток;
- факторов приобретенного иммунитета: гуморального и клеточного.

Активация клеток моноцитарно-макрофагальной системы ведет к повышению миграции нейтрофилов в воспалительный очаг, усилению активности лизосомальных ферментов, повышению способности фагоцитов поглощать и убивать микробы. Поэтому практически сразу после введения ПО происходит резкое усиление антиинфекционной резистентности организма, что хорошо демонстрируется в эксперименте: предварительное введение ПО повышает устойчивость животных к заражению несколькими штаммами патогенных микробов. Другое важное иммуномодулирующее свойство ПО — его способность усиливать образование антител как к тимусзависимым, так и к тимуснезависимым антигенам. При совместном введении с данными антигенами ПО усиливает антителообразование в десятки раз. Одновременно с этим происходит и активация клеточного иммунитета. Повышается способность естественных киллеров и антигеннеспецифических Т-киллеров убивать

клетки, зараженные внутриклеточными возбудителями: вирусами, хламидиями, микоплазмами и др. [4, 7].

При урогенитальных инфекциях ПО применяется в инъекционной форме и виде суппозиториев в 3 дозах: 3 мг, 6 мг и 12 мг. Доза в 3 мг недостаточно эффективна. Дозы в 6 мг и 12 мг дают практически одинаковые результаты. Поэтому основной для лечения урогенитальных инфекций с помощью инъекций принята доза в 6 мг. Применение ПО в указанной форме показало высокую эффективность в комплексном лечении хламидийных уретритов, простатитов, цервицитов, сальпингоофоритов, трихомонадного уретрита, генитального герпеса [1, 7]. Эффективность применения ПО заключалась в полном клиническом выздоровлении и исчезновении возбудителей из патологического материала у 95% больных опытной группы (в контрольной группе этот показатель составил 70—75%). Кроме того, применение ПО в комплексном лечении позволило в 2 раза сократить сроки лечения, снизить дозу антибиотиков, уменьшить частоту отдаленных рецидивов заболевания.

На основании полученных данных сделан вывод о высокой эффективности ПО в комплексном лечении хламидийных урогенитальных инфекций и о перспективности его использования в комплексе с хламидийным антигеном при создании противохламидийной вакцины.

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 *C. trachomatis*.

Цель исследования заключалась в изучении развития протективного иммунного ответа у мышей линии BALB/c при экспериментальной хламидийной инфекции, вызванной интравагинальным введением антигенного препарата, приготовленного на основе штамма МТ2 *C. trachomatis* с ПО по лечебной схеме.

Материал и методы

Для моделирования хламидийной инфекции использован авторский высокоиммуногенный штамм *C. trachomatis* МТ-2А (серовар D), выделенный в 2001 г. из эпителия уретры больного, длительно лечившего по поводу ХУГХ. Штамм охарактеризован и депонирован в Национальную коллекцию вирусов и бактерий НИИ эпидемиологии и микробиологии (государственная регистрация НКВ-№ Х3–3 от 04.11.2002) [5]. Обоснованием для выбора серовара D МТ-2А штамма *C. trachomatis* стали результаты исследований, показавшие, что на территории Республики Беларусь в настоящее время циркулируют серотипы D (54,7%) *C. trachomatis,* вызывающие развитие уретрита, аднексита, эндоцервицита и другой патологии у женщин.

При выполнении 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 $5 \cdot 10^5$ ТЦД$_{50}$/мл составляла $1{,}7 \cdot 10^6$ копий/мл. Секвенирование гена omp1, кодирующего МОМР-белок, показало, что штамм *C. trachomatis* МТ-2А соответствовал серовару D и на 95% был гомологичен стандартному штамму D/B185 (X62919) из американской коллекции типовых культур [5, 6].

В экспериментах использовали 17 самок мышей BALB/c 5—6-недельного возраста с массой 15—20 г. Было сформировано 2 группы животных: 1-я — опытная (11 мышей), в которую вошли мыши, получавшие хламидийный антиген с ПО по лечебной схеме (нулевая точка — начало опыта), и 2-я — контрольная (6 мышей). Перед проведением опыта мышей содержали на карантине в течение 2 нед. Животные 1-й группы были инфицированы штаммом *C. trachomatis* МТ-2А (доза $5 \cdot 10^5$ ТЦД$_{50}$/мл) путем внутривагинального введения в объеме 30 мкл, животные 2-й группы получали аналогичные инъекции фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Развитие инфекции контролировали, исследуя смывы из вагины мышей методом РИФ. Накопление антител в сыворотках крови (IgG, IgM) и смывах из вагины (sIgA) определяли методом ИФА каждые 7 дней в течение 49 дней.

Хламидийный антигенный препарат мышам опытной группы вводили через 30 дней после начала опыта. Антиген с ПО вводили интравагинально ежедневно (7 раз). Через 12 дней после лечения (через 49 сут после начала опыта) проводили реинфицирование в обеих группах, вводя *C. trachomatis* также в объеме 30 мкл (титр $5 \cdot 10^5$ ТЦД$_{50}$/мл). Наличие инфекции регистрировали культуральным методом, инфицированные культуры идентифицировали окрашиванием по Романовскому—Гимзе через 72 ч и методом РИФ.

Для гистологических исследований на 30-е и 40-е сутки были вскрыты 4 животных (по 2 соответственно). Для электронной микроскопии образцы культуры клеток McCoy, инфицированной штаммом *C. trachomatis* МТ-2А, заключали в аралдит по общепринятой методике [5]. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме «Ultracut» («Reichert-Jung», Австрия) и исследовали с помощью электронного микроскопа «JEOL-100CX» («Jeol», Япония) при увеличении 10 000, 20 000, 36 000.

Статистический анализ проведен с использованием программы пакета STATISTICA 6.0, достоверной признавалась 95% вероятность различий ($P<0{,}05$).

Результаты и обсуждение

Возбудитель *C. trachomatis,* штамм МТ-2А (серовар D), накапливали в культуре клеток McCoy. Максимальных титров ($5 \cdot 10^5$ ТЦД$_{50}$/мл) возбудитель достигал через 72 ч культивирования. Электронно-микроскопический анализ показал, что при репродукции штамм *C. trachomatis* МТ-2А сохранял относительно невысокий уровень цитодеструктивного действия. При анализе ультратонких срезов клеток McCoy, 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 изменял свою ультраструктуру, сохранялась целость клеточной стенки и все этапы морфогенеза — от РТ до ЭТ.

Таким образом, морфологические и ультраструктурные характеристики штамма *C. trachomatis* МТ-2А соответствовали общим признакам стабильности. Формирования атипичных включений с абберантными формами РТ не отмечено, что позволило использовать его в экспериментах по моделированию внутривагинальной хламидийной инфекции на мышах.

Клинические наблюдения (контроль веса, поведения и внешнего вида мышей: состояние конъюнктивы глаз, шерстного покрова) проводили в одно и то же время суток. 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 1-й 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-е сутки. К 49-м суткам наступало постепенное восстановление шерстного покрова. Подобных изменений не было зарегистрировано в контрольной (2-я) группе. Гибели животных не отмечалось ни в одной из групп.

Верификацию инфекционного процесса, возникшего после инфицирования животных культурой *C. trachomatis* у животных 1-й и 2-й группы, проводили различными методами, включая выявление возбудителя в вагинальных смывах. Результаты наличия продуктивной инфекции фиксировали через 72 ч методами окрашивания по Романовскому—Гимзе и РИФ.

В табл. 1 представлены результаты выявления *C. trachomatis* в культуре клеток в динамике эксперимента в опытной группе животных, получавших после инфицирования (моделирование 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-му дню наблюдения достигнута его полная элиминация. После проведения реинфицирования (49-й день опыта) отмечено повторное выделение *C. trachomatis*, которое прекратилось к 84-му дню.

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

Как видно из табл. 2, динамика содержания острофазовых иммуноглобулинов (IgM) в полной мере повторяла динамику выделения клеток возбудителей. Первые признаки специфического иммунного ответа были зафиксированы на 7-й день, максимальные титры антител — на 14-й, затем происходило быстрое их снижение и к 35-му дню антитела данного класса, характеризующие острую фазу инфекционного процесса, не определялись. Очевидно, что реинфицирование не вызывало столь заметного, особенно по продолжительности, иммунного ответа, антитела данного класса исчезали спустя 2 нед после реинфицирования.

Значительный интерес имели данные по динамике иммуноглобулинов «памяти», к которым относятся IgG (см. табл. 2), со 2-й недели инфицирования начинался рост уровня антител данного класса, который продолжался весь период наблюдения, причем значительное увеличение данного показателя произошло спустя 1 нед после инфицирования. Максимальный «кумулятивный» эффект накопления IgG, зафиксированный спустя 2 нед после инфицирования, совпадал с исчезновением из крови IgM и сохранялся на высоких показателях в течение всего 98-дневного наблюдения за животными.

Изменение содержания секреторных иммуноглобулинов, свидетельствующих о специфическом местном иммунном ответе, напоминало динамику уровня сывороточных антител класса G. После их появления на 2-й неделе они выявлялись в течение всего периода наблюдения, причем максимальной концентрации достигали после реинфицирования.

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

В опытной группе лечение начинали через 30 дней после начала опыта.

Как видно из табл. 3, средние показатели содержания *C. trachomatis* в культуре клеток McCoy в опытной группе были аналогичны таковым без применения спе-

Таблица 1

Концентрация *C. trachomatis* в культуре клеток McCoy в опытной группе животных в динамике моделирования внутривагинальной хламидийной инфекции (титры ТЦД$_{50}$/мл)

День опыта	Концентрация *C. trachomatis*
0-й — инфицирование	0
7-й	$5{,}5\cdot10^4$
14-й	$4{,}6\cdot10^3$
21-й	$2{,}8\cdot10$
28-й	0
31—37-й — период введения антигена и ПО	0
38—48-й — период после лечения	0
49-й — реинфицирование	0
56-й	$2{,}62\cdot10^4$
63-й	$3{,}25\cdot10^4$
70-й	$1{,}4\cdot10^3$
77-й	$1{,}3\cdot10^2$
84-й	0
91-й	0
98-й	0

Таблица 2

Содержание иммуноглобулинов к *C. trachomatis* в сыворотке крови и в смывах из вагины у животных опытной группы в динамике моделирования внутривагинальной хламидийной инфекции

День опыта	IgM	IgG	sIgA
0-й — инфицирование	0	0	0
7-й	133±34,4	5±1,7	5
14-й	212±56,0	24,0±12,8	32±8,9
21-й	65±17,5	85,0±27,5	100±29,2
28-й	1±0,01	163,0±46,5	92±28,5
35-й	0	370,0±79,0	96±14,9
42-й	0	580,0±138,1	92±28,5
49-й — реинфицирование	0	430,0±87,0	90±16,7
56-й	116±15,1	980,0±180,0	134±34,0
63-й	26±7,8	1040,0±160,0	114±28,3
70-й	0	880±130,0	92±16,7
77-й	0	860±140,0	94±15,8
84-й	0	920±120,0	92±19,6
91-й	0	880±130,6	91±20,0
98-й	0	860±140,0	87±20,7

цифической терапии. Элиминация возбудителя происходила к 28-му дню наблюдения. В дальнейшем сравнительный анализ выявил различия. В группе животных, получавших хламидийный антиген и ПО, выделение возбудителя зафиксировано лишь на 56-й день наблюдения, далее культуральный метод давал 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.

Таблица 3

Концентрация *C. trachomatis* в культуре клеток McCoy в опытной группе животных в динамике интравагинального введения антигенного препарата (титры ТЦД$_{50}$/мл)

День опыта	Концентрация *C. trachomatis*
0-й — инфицирование	0
7-й	$5,4 \cdot 10^4$
14-й	$5,5 \cdot 10^3$
21-й	3,6·10
28-й	0
31—37-й — период введения антигена и ПО	0
38—48-й — период после лечения	0
49-й — реинфицирование	0
56-й	$1,32 \cdot 10^2$
63-й	0
70-й	0
77-й	0
84-й	0
91-й	0
98-й	0

Как видно из табл. 3, накопление титров антител в первый период наблюдения (до применения антигенного препарата) происходило аналогично динамике титров в группе без лечения. После введения антигенного препарата в крови животных происходило резкое увеличение содержания 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.

Начиная с 49-го дня наблюдения происходило значительное увеличение количества секреторных иммуноглобулинов, свидетельствующее об активации гуморального иммунитета у животных на введение антихламидийного антигена в сочетании с иммуномодулятором ПО (табл. 4).

Таким образом, полученные в ходе эксперимента данные об интравагинальном введении штамма *C. trachomatis* MT-2A (серовар D) подтверждают высокую иммуногенность данного штамма, что может быть использовано для моделирования хламидийной инфекции при изучении закономерностей патогенеза.

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

Доказательство высокой иммуногенности применяемого штамма *C. trachomatis* MT-2A (серовар D), его высокой специфичности и положительной динамики показателей гуморального иммунитета после введения антигена в комбинации с ПО позволяет обосновать проведение дальнейшей работы по созданию опытного образца внутривагинальной вакцины для лечения ХУГХ у людей и начала доклинических испытаний препарата.

Таблица 4

Содержание IgG к *C. trachomatis* в сыворотке крови и sIgA в вагинальных смывах у животных опытной группы в динамике интравагинального введения антигенного препарата

День опыта	IgG	sIgA
0-й — инфицирование	0	0
7-й	17±9,3	7±1,5
14-й	36±14,0	36±8,2
21-й	94,0±26,3	92±15,8
28-й	133,0±38,5	88±28,9
31—37-й — период введения антигена и ПО	0	0
49-й — реинфицирование	1120±265,3	172±34,8
56-й	1840±316,7	178±62,0
63-й	2000±342,5	164±36,0
70-й	1920±297	156±30,7
77-й	1880±315,8	148±23,9
84-й	1840±240	136±35,3
91-й	1760±261,3	146±34,0
98-й	1840±240,0	172±34,8

Примечание. С 29 по 48-й день кровь не исследовали.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гомберг М. А., Соловьев А. М., Черноусов А. Д. // ИППП.— 2000.— № 2.— С. 30—35.*
2. *Костюк С. А., Хворик Д. Ф. // Мед. панорама.— 2005.— № 9.— С. 42—43.*
3. *Мавров Г. И. Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика.— Киев, 2006.*
4. *Никитин А. А. и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 2004.— Т. 138, № 9.— С. 293—295.,*
5. *Полещук Н. Н., Капитулец Н. Н., Рубаник Л. В. и др. // Здравоохранение.— 2005.— № 11.— С. 46—50.*
6. *Полещук Н. Н. и др. // Молекулярная диагностика инфекционных заболеваний: Материалы междунар. науч.-практ. конф.— Минск, 2007.— С. 71—72.*
7. *Редькин Ю. В., Одокиенко А. Ю. // Вестн. дерматологии и венерологии.— 2006.— № 3.— С. 57—62.*
8. *Хворик Д. Ф., Костюк С. А., Цыркунов В. М., Конкин Д. Е. // Здравоохранение.— 2008.— № 4.— С. 64—68.*
9. *Хворик Д. Ф., Цыркунов В. М., Костюк С. А. // Здравоохранение.— 2008.— № 6.— С. 62—65.*

Поступила 05.06.08.

IMMUNITY FORMATION UNDER EXPERIMENTAL CHLAMYDIAL UROGENITAL INFECTION

D. F. Khvorik, V. M. Tsyrkunov, N. N. Poleshchuk, S. A. Kostyuk, N. N. Kapitulets, S. P. Kapitulets, L. V. Rubanik

The author's highly immune strain of C. trachomatis *MT-2A (D serovar) separated in 2001 from the epithelium of the patient having been treated for chronic urogenital infection for a long time was used for modeling experimental chlamydial infection. Seventeen 5—6 week old female mice BALB/c (body mass 15—20 gr) were included into the study. The mice were infected by C. trachomatis in the volume of 30 мL (titer 5 x 10^5 TCD_{50}/mL). The animals were divided into two groups: the 1st group included eleven mice receiving clamydial antigen accompanied by Polyoxidonium in accordance with the therapeutic scheme, the 2nd group included six untreated mice. The infection development was controlled — the vaginal wash-outs were studied in RIF. The serum antibodies (IgG, IgM) and the vaginal secretory antibodies (sIgA) had been determined by IFA every 7 days for 49 days. The data received confirmed the strain high immunogeneity, the chlamydial infection development in mice. The method might be used for modeling chlamydial infection for studying the pathogenesis mechanism.*