

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

СІРОМОЛОТ АНДРІЙ АНДРІЙОВИЧ

УДК 616-002.5+577.112+579.62

**ІМУНОБІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АНТИГЕНІВ *Mycobacterium*
spp. MPT63 і MPT83 ТА ЇХ РОЛЬ У ДІАГНОСТИЦІ ТУБЕРКУЛЬОЗУ**

03.00.09 – імунологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі мікробіології та імунології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка та у лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Колибо Денис Володимирович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
завідувач лабораторії імунобіології відділу
молекулярної імунології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Тукало Михайло Арсентійович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу ензимології білкового синтезу;

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Любич Лариса Дмитрівна,
Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад.
А.П. Ромоданова Національної академії медичних наук
України», завідувач лабораторії культивування тканин

Захист відбудеться «25» лютого 2019 року о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університету імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала № 12

Автореферат розісланий: «21» січня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Туберкульоз — небезпечне інфекційне захворювання, яке спричиняється близькоспорідненими видами мікроорганізмів, що відносяться до групи *Mycobacterium tuberculosis complex*, і характеризується утворенням одного або багатьох осередків запалення в різних органах, але найчастіше у лімфатичних вузлах і легеневій тканині [Matsegora N.A. et al., 2017]. З початку 90-х років захворюваність на туберкульоз та смертність від нього в Україні збільшилися майже втричі, що, за критеріями ВООЗ, відповідає епідемії, яка проголошена в Україні з 1995 р [Фещенко Ю.І. та ін., 2015]. Ситуацію ускладнює прогресування захворювань, викликаних резистентними до ліків штамми (MDR-TB, multidrug resistant tuberculosis), в тому числі, через неконтрольоване вживання антибіотиків [Hoffner S., 2016].

Туберкульоз великої рогатої худоби (ВРХ) є серйозною проблемою для сільського господарства як в Україні, так і у багатьох країнах світу [Redchuk T.A. et al., 2010]. В той же час, інфекції, викликані *Mycobacterium bovis*, не тільки наносять шкоду тваринництву та харчовій промисловості, але також є небезпечними для здоров'я населення, адже останніми роками *M. bovis* все частіше ізолюють як збудник туберкульозу у людей, зокрема, у пацієнтів з різними імунодефіцитами [Rhodes S.G. et al., 2014].

Завершення проекту з секвенування геному мікобактерії [Cole S.T., 1998; Fleischmann R.D. et al., 2002] стало поштовхом у напрямку ідентифікації, дослідження функцій і властивостей нових антигенних мішеней для створення вакцин та діагностичних тестів [Sharma D. et al., 2017]. Імунодомінантні антигени *Mycobacterium spp.* МРТ63 та МРТ83 – це протеїни з досі невизначеними функціями. Відомо, що МРТ63 здатний викликати запальний процес через дегрануляцію тучних клітин [Munoz S. et al., 2003]. МРТ83 є одним з лігандів Toll-подібного рецептора 2 (TLR-2) [Chambers M.A. et al., 2010; Becker K. et al., 2017]; також, описаний як індуктор апоптозу інфікованих макрофагів шляхом активації сигнального шляху TLR2 / p38 / COX-2 [Wang L. et al., 2017]. Хоча до недавнього часу макрофаги вважали основними мішенями мікобактерій [Gonzalez-Juarrero M. et al., 2011], інші типи клітин також можуть бути вражені ними, а значить і відігравати не останню роль у розвитку хвороби. До таких клітин відносять гранулоцити і дендритні клітини [Marino S. et al., 2004], епітеліоцити та фібробласти [Saiga H. et al., 2008; Gonzalez-Avila G. et al., 2009] тощо.

Головним етапом у боротьбі з епідемічною та епізоотичною ситуацією є пошук нових та удосконалення існуючих методів діагностики захворювання. Висока імуногенність та обмежена представленість антигенів МРТ63 та МРТ83 у геномах інших мікобактерій [Manca C. et al., 1997; Sinha P. et al., 2016] дозволила використати ці протеїни у створенні імуносорбенту для визначення антитіл до збудника у сироватці крові хворих тварин [Redchuk T.A. et al., 2010] та людей. Водночас, створення химерного протеїну МРТ83-МРТ63 дозволяє ефективно представляти серологічно важливі епітопи обох антигенів на відміну від суміші окремих протеїнів або тотального лізату.

Таким чином, вивчення імунобіологічних властивостей антигенів *Mycobacterium* з метою з'ясування їх ролі в механізмах розвитку мікобактеріальної інфекції та для розробки нових вакцин і діагностикумів, є актуальним завданням сучасної імунології, медицини та ветеринарії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана на кафедрі мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка в рамках бюджетної теми «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.) та в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках бюджетних тем «Розробка промислового зразка тест-системи для серологічної діагностики туберкульозу» (№ д/р 0115U001969, 2015-2016 рр.) та «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (№ д/р 0115U001969, 2017-2021 рр.).

Мета і задачі дослідження: метою роботи було оцінити вплив протеїнів МРТ63 та МРТ83 *M. tuberculosis* на фагоцитарні та інші соматичні клітини, що залучені до патогенезу туберкульозу, і розробити діагностичні тест-системи на основі цих антигенів.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Одержати генетичні конструкції на основі прокаріотичних експресійних векторів для отримання повнорозмірної форми МРТ83, флуоресцентних похідних МРТ63 та МРТ83 та химерного протеїну МРТ83-МРТ63. Оптимізувати умови експресії та виділення рекомбінантних антигенів *M.tuberculosis*.
2. Ідентифікувати клітини-мішені рекомбінантних аналогів МРТ63 та МРТ83 *M.tuberculosis* серед різних популяцій клітин організму.
3. Дослідити вплив мікобактеріальних протеїнів на процес активації макрофагів.
4. Встановити наслідки впливу антигенів мікобактерій на клітини чутливих до туберкульозу організмів *in vitro*.
5. Розробити та випробувати прототипи імуноензимних тест-систем для визначення рівня антитіл до *M.tuberculosis/M.bovis* з метою скринінгу людської популяції та поголів'я худоби.

Об'єкт дослідження: рекомбінантні аналоги протеїнів *M. tuberculosis* МРТ63, МРТ83 та злитого антигену МРТ83-МРТ63.

Предмет дослідження: імунобіологічні властивості протеїнів *M. tuberculosis complex* МРТ63 та МРТ83 в патогенезі та діагностиці туберкульозу.

Методи дослідження: імунологічні (імунізація тварин, імуноензимний аналіз (ІЕА), фагоцитарний тест, протокова цитометрія, конфокальна мікроскопія), біохімічні (гель-електрофорез для розділення протеїнів та ДНК, метал-афінна хроматографія для очищення протеїнів, спектрофотометрія, спектрофлуориметрія), молекулярно-біологічні (отримання рекомбінантних протеїнів), мікробіологічні, хімічні (ковалентне мічення протеїнів флуоресцентними мітками), методи роботи із культурою евкаріот (культивування первинних та малігнантних евкаріотичних

клітин), обчислювальні (розрахунок концентрацій і молекулярних мас протеїнів та ДНК) і статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі вперше отримано генетичні конструкції рекомбінантних антигенів *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83, злитих з червоним флуоресцентним протеїном mCherry. Доведено високу імуногенність MPT63 та MPT83 в експериментальних дослідженнях *in vivo*.

Удосконалено генетичну конструкцію, що кодує злитий протеїн MPT83-MPT63 на основі повнорозмірних рекомбінантних антигенів мікобактерій. Визначено переваги його використання для імуноензимних тест-систем у порівнянні з існуючими аналогами.

Вперше виявлено потенційні клітини-мішені імунодомінантних антигенів *Mycobacterium spp.* MPT63 та MPT83. Розширено існуючі уявлення щодо посилення мікобактеріальними протеїнами фагоцитарної активності клітин природного імунітету.

Практичне значення одержаних результатів. На основі отриманих продуктів злиття антигенів *M.tuberculosis/M.bovis* MPT63 та MPT83 створено унікальні тест-системи «IB-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*» та «IB-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*», що дозволяють визначити вміст антитіл до *M.tuberculosis/M.bovis* в периферичній крові пацієнтів та хворих тварин. Промислові зразки захищені патентами України (№ 100065. 2015 жовт. 07; № 118447. 2017 лип. 10).

Матеріали дисертації впроваджені у навчальний процес ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка при викладанні спецкурсу «Імунобіотехнологія» та факультету біотехнології і біотехніки НТУУ «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» при викладанні спецкурсу «Теорія і практика біотехнологічного експерименту».

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником д.б.н., професором Д.В. Колибо розроблено концепцію дисертаційного дослідження, поставлені мета та завдання дисертаційного дослідження. Усі наукові результати дисертаційної роботи отримано автором самостійно або за його безпосередньої участі. Дисертантом проведено інформаційний пошук, експериментальні дослідження та аналіз результатів; особисто отримано флуоресцентні похідні мікобактеріальних антигенів, їх генетичні конструкції та штами-продуценти; проведено дослідження фагоцитарної активності та дозрівання макрофагів за впливу MPT63 та MPT83.

Автор висловлює щирі вдячність усім співробітникам лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна за надану методичну та консультативну допомогу.

Апробація результатів дисертації. Основні результати наукових досліджень оприлюднено на: міжнародному симпозіумі «2nd Prague European Days of Internal Medicine», (Прага, Чехія, 2016), міжнародній конференції «PHOENIX 2017» (Мангалор, Індія, 2017), IV міжнародному медико-фармацевтичному конгресі «Інновації та перспективи сучасної медицини» (Чернівці, Україна, 2017), XIII

міжнародній науковій конференції «Молодь та поступ біології» (Львів, Україна, 2017), міжнародній імунологічній школі «9th EFIS-EJI South Eastern Europe Immunology School (SEEIS2017)» (Львів, Україна, 2017), міжнародній конференції «Horizons in Molecular Biology» (Гьотінген, Німеччина, 2017), III міжнародній конференції «Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century» (Київ, Україна, 2018). Практичні результати дисертації щодо впровадження тест-систем для діагностики туберкульозу були представлені на Фестивалі інновацій при Науковому парку Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, Україна, 2016) та Фестивалі інноваційних проектів «Sikorsky Challenge 2017» Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (Київ, Україна, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць, з них 5 статей (з них 1 – у виданні, що входить до міжнародних наукометричних баз даних SCOPUS та PubMed; 1 – у виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази даних Web of Science), а також 8 тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях, дисертант є співавтором 2 патентів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 7 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел (158 найменувань, з них кирилицею – 9, латиницею – 149), 1 додатку. Загальний обсяг дисертації становить 172 сторінки друкованого тексту, основну частину роботи викладено на 133 сторінках, проілюстровано 58 рисунками, 2 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Лабораторні тварини, зразки сироваток крові тварин та пацієнтів. Усі маніпуляції з лабораторними тваринами (3-4 міс. самки мишей лінії BALB/c) проводили в акредитованому віварії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України згідно з принципами біоетики, законодавчих норм та вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (2006). Зразки сироваток периферичної крові особин ВРХ з різним імунологічним статусом (n=55) були надані ННЦ «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини» (м. Харків, Україна). Зразки сироваток венозної крові пацієнтів (умовно-здорових – 17; хворих на нетуберкульозні захворювання легень – 22; хворих на туберкульоз – 37) були надані ДУ «Національний Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського Національної академії медичних наук України». Пацієнти були проінформовані та надали дозвіл на використання їх біологічних зразків для наукових цілей.

Створення генетичних конструкцій та виділення рекомбінантних антигенів. Ділянки ДНК, що відповідали кодуючим послідовностям МРТ63 і МРТ83, отримували полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) з використанням у якості

матриці ДНК вакцинного штаму *M.bovis BCG-Russia* та відповідних специфічних праймерів. Для ампліфікації гену флуоресцентного протеїну mCherry використовували плазмідну ДНК *pmCherry* (Clontech, США). Отримані ДНК фрагменти, що відповідали нуклеотидній послідовності генів флуоресцентних протеїнів і мікобактеріальних антигенів, об'єднували в єдину рамку зчитування та субклонували в плазмідні вектори *pET-24a* і *pET-28a* (Novagen, США), якими трансформували бактерії *E. coli* штаму BL21 Rosetta (DE3) (Novagen, США).

Експресію рекомбінантних антигенів індукували 1мМ ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозидом. Очищення протеїнових фракцій проводили методом афінної хроматографії на сорбенті Ni²⁺-NTA агарозі (Sigma, США) у денатуруючих або нативних умовах. Чистоту протеїнових фракцій аналізували за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі за Лемлі у модифікації [Schagger H. and von Jagow J., 1987].

В роботі було використано клітинні лінії U937 (моноцитарні клітини з гістіоцитарної лімфоми людини), U2149 (гетерогенна лінія фібробласто- та макрофагоподібних клітин людини), J774 (макрофаги, отримані з миші лінії BALB/c), A431 (клітини епітеліального походження з аденокарциноми людини), 3T3 (фібробластоподібні клітини з ембріональної тканини миші), KG-1 (мієлобласти людини), P3X63 (В-лімфоцити з лімфобластоми миші), які були отримані з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.С. Кавецького НАН України.

Визначення проліферативної активності клітин за допомогою МТТ тесту. Клітини нарощували до конфлуентного стану у 96-лункових планшетах. Антигени вносили у концентраціях: ліпополісахарид (ЛПС) – 500 нг/мл, МРТ63, МРТ83 та mCherry – 10 мкг/мл. Культуральне середовище замінювали на нове із додаванням МТТ реагенту (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) та інкубували у відповідності до рекомендації виробника (Sigma, США). Розчинення кристалів формазану та вимірювання оптичної щільності виконували згідно [Manoilov K. et al., 2016].

Протокова цитофлуориметрія. Визначення фагоцитарної активності макрофагів. Перитонеальні макрофаги миші ($1,5 \times 10^6$) висівали на чашку та інкубували за стандартних умов. Потім вносили МРТ63, МРТ83 чи mCherry у 0,25 мкМ концентрації. Клітини інкубували з відповідними антигенами упродовж 30 хв, 1 год та 3 год. Після відмивання додавали клітини *E.coli*, трансформовані зеленим флуоресцентним протеїном EGFP ($1,5 \times 10^8$ клітин на чашку), та інкубували упродовж 30 хв за 4° С. Інтенсивність флуоресценції, що свідчила про поглинання *E.coli*-EGFP макрофагами, вимірювали за допомогою протокового цитофлуориметра EPICS XL („Beckman Coulter”, США).

Оцінка впливу мікобактеріальних антигенів на маркери активації макрофагів. Макрофаги миші інкубували з цільовими рекомбінантними антигенами *M.tuberculosis* МРТ63 і МРТ83 та контрольним протеїном mCherry упродовж 24 год як описано вище. Для визначення експресії CD11b (інтегрин, що у великих кількостях представлений на активованих макрофагах і дендритних клітинах) та F4/80 (маркер зрілих макрофагів миші) використовували FITC-мічені моноклональні

антитіла (ThermoScientific) згідно інструкцій виробника. Комп'ютерний аналіз даних з протокового цитофлуориметра проводили за допомогою програмного забезпечення Flowing Software (Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology, Фінляндія).

Підготовка фіксованих препаратів для конфокальної мікроскопії. До клітин ліній U2149, J774 та перитонеальних макрофагів миші додавали МРТ63, МРТ83 та mCherry в розрахунку по 0,25 мкмоль/мл. Фіксацію клітин та скелець проводили згідно [Siromolot A., Kolibo D., 2018]. Для контрастування ядер використовували Hoechst 33342. Препарати аналізували за допомогою конфокального мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 Meta. Отримані дані забарвлення клітинних структур аналізували за допомогою програмного забезпечення FIJI.

Непрямий імуоензимний аналіз. Випробування створених на основі антигену МРТ83-МРТ63 та комерційних тест-систем, аналіз результатів тестування сироваток крові виконували згідно інструкцій виробників.

Математичну обробку та статистичний аналіз отриманих даних виконували за допомогою програм Microsoft Excel та Origin 8.0. Нормальність розподілу даних у групах перевіряли за допомогою W-критерію Шапіро-Вілка та застосовували параметричний t-критерій Стьюдента. Наведено середні значення (M) та стандартне відхилення від середнього (m).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одержання генетичних конструкцій, що кодують рекомбінантні аналоги антигенів *M.tuberculosis* МРТ63 і МРТ83 та їх флуоресцентні похідні. Експресія та очищення рекомбінантних протеїнів. Було отримано клітини-продуценти *E.coli* рекомбінантних антигенів МРТ83, mCherry-МРТ63, mCherry-МРТ83 та химерного протеїну МРТ83-МРТ63. Було ампліфіковано гени мікобактеріальних антигенів з ДНК вакцинного штаму *M.bovis-BCG* Russia за допомогою ПЛР. Ген *mcherry* одержали з вектору *pmCherry* (Clontech, США) (рис. 1). Очищені ПЛР-продукти були використані для створення генетичних конструкцій на основі векторів для експресії *pET24a(+)* та *pET28a(+)*. Одержаними плазмідними ДНК *pET24a-MPT83*, *pET28a-MPT83-MPT63* *pET28a-mCherry-MPT63* та *pET28a-mCherry-MPT83* трансформували клітини *E.coli* штаму BL21 Rosetta (DE3) (Novagen, США).

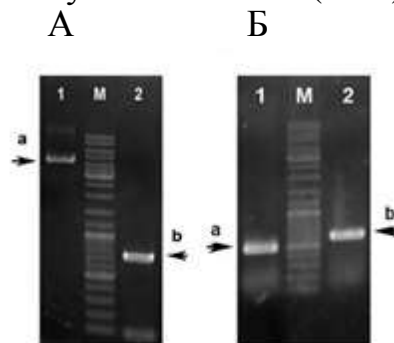


Рис. 1. Електрофореграма виділеної плазмідної ДНК *pET28a* (А,1а) та продуктів ампліфікації генів *mcherry* (А,2b), *mpt63* (Б, 2а) і *mpt83* (Б, 2b). М – маркери молекулярної маси, п.н.

Оптимізовано протоколи експресії (оптична щільність культури бактерій, температурний режим, час інкубації з індуктором експресії) та очищення рекомбінантних антигенів. Оскільки цільові протеїни (окрім МРТ83) синтезувались майже повністю у нерозчинній формі, для їх використання проводили подальший рефолдинг шляхом зниження концентрації сечовини. Чистоту та вихід протеїнів перевіряли методом ДСН-ПААГ електрофорезу та денситометрично (рис. 2).

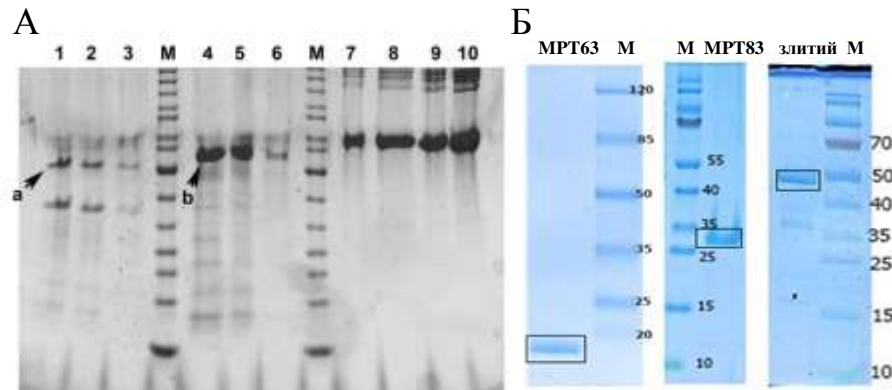


Рис. 2. Електрофореграма фракцій елюату mCherry-МРТ63 (1, 2, 3), mCherry-МРТ83(4, 5, 6) та бичачого сироваткового альбуміну різної концентрації (7, 8, 9, 10) (А). Електрофореграма очищених антигенів МРТ63, МРТ83 та злитого антигену МРТ83-МРТ63 (Б). М – маркери молекулярної маси, кДа. Цільові антигени виділені стрілками або в рамку

Таким чином, нами були створені рекомбінантні аналоги антигенів *M.tuberculosis* та їх флуоресцентні похідні. Розроблено підходи до їх очищення та одержання в препаративних кількостях.

Взаємодія антигенів *M.tuberculosis* МРТ63 та МРТ83 з клітинами-мішенями. Оскільки макрофаги є основною мішенню збудника туберкульозу [Berrington W.R. et al., 2007], ми дослідили зв'язування МРТ63 та МРТ83 з поверхневими структурами перитонеальних макрофагів миші. Проте достовірного зв'язування МРТ63 виявити не вдалося (рис. 3).

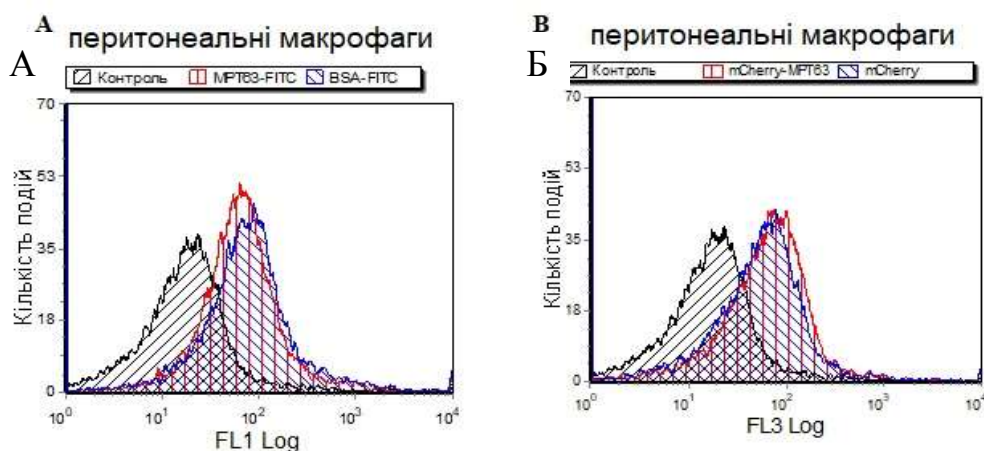


Рис. 3. Гістограми інтенсивності флуоресценції перитонеальних макрофагів, інкубованих з антигеном *M.tuberculosis* МРТ63, кон'югованого з FITC (А) та зшитого з червоним флуоресцентним протеїном mCherry (Б). Протокова цитофлуориметрія

Виходячи з того, що існує можливість порушення функціональних характеристик МРТ63 в процесі приєднання мітки, було використано два флуоресцентних похідних МРТ63, спосіб отримання яких принципово відмінний: злиття з mCherry (МРТ63 розташовано на С-кінці молекули) та кон'югація з FITC (що приєднується за ϵ -аміногрупами амінокислоти лізину).

На відміну від макрофагів, при використанні спленоцитів миші чітко ідентифікувалась субпопуляція, що забарвлювалась МРТ63 (рис. 4).

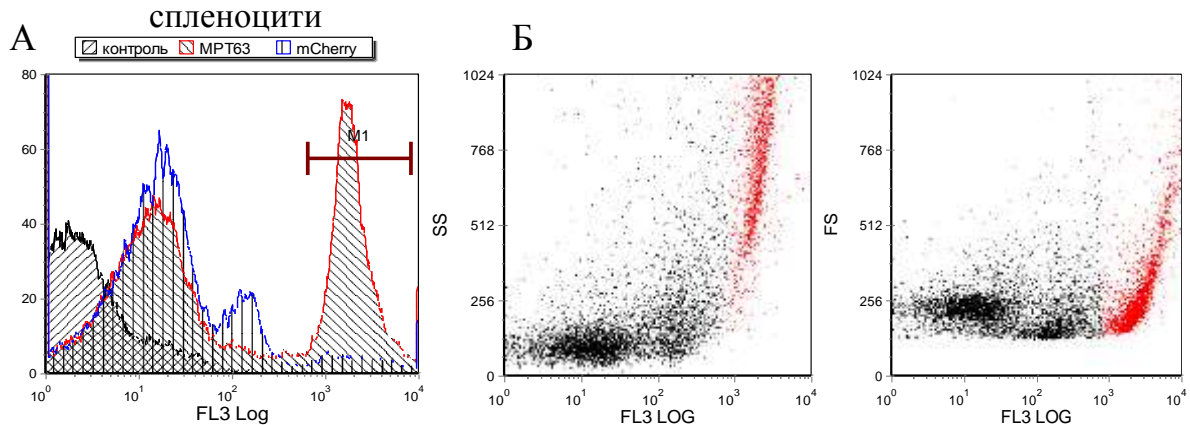


Рис. 4. Гістограма інтенсивності флуоресценції спленоцитів миші, інкубованих із флуоресцентно міченим МРТ63 (А). Розподіл клітин за бічним (Side Scatter, SS) та прямим (Forward Scatter, FS) світлорозсіюванням, що характеризують гранулярність і розміри клітин відповідно (Б)

Однак в селезінці представлені різні клітини, включно з лімфоцитами, макрофагами, дендритними клітинами на різних стадіях диференціювання, та стромальними клітинами, що не належать до імунної системи. Проте зв'язування МРТ63 з клітинними лініями, що є моделями лімфоцитів, фіброblastів та епітеліоцитів виявити не вдалося (рис. 5).

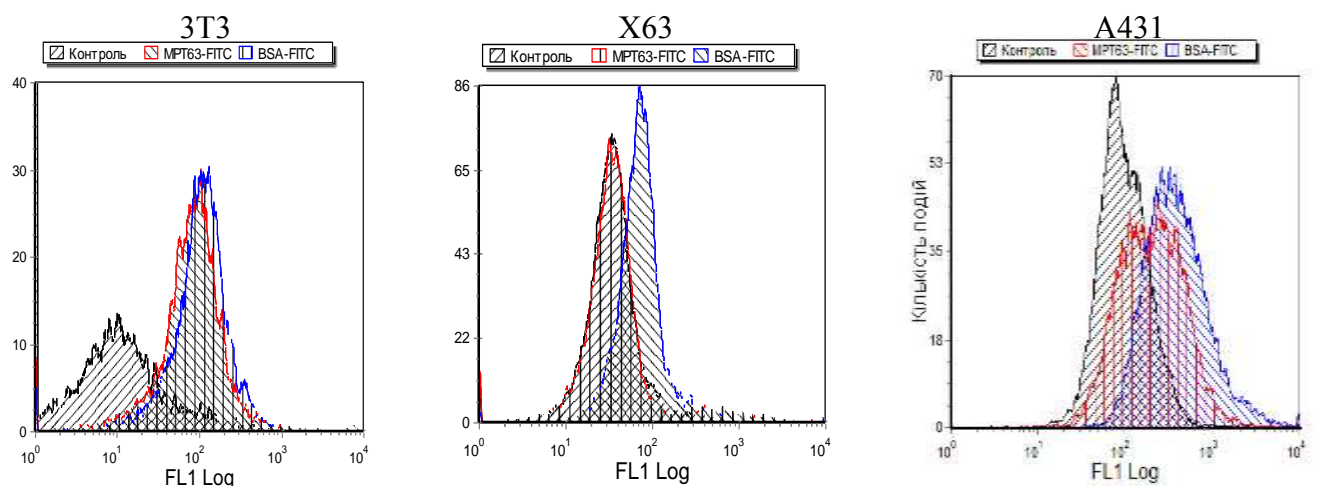
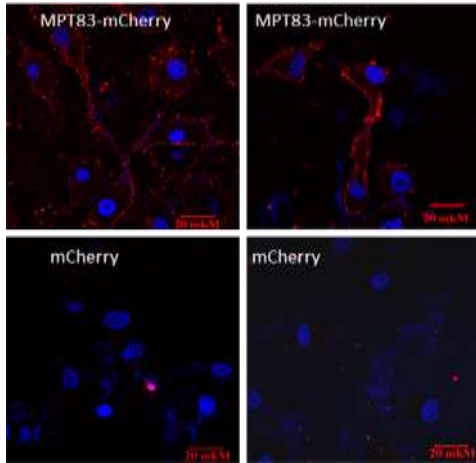


Рис. 5. Гістограми інтенсивності флуоресценції клітин ліній 3Т3 (фіброблостоподібні), Х63 (лімфоцитоподібні) та А431 (епітеліоцитоподібні), інкубованих із флуоресцентно міченим МРТ63. Протокова цитофлуориметрія

Хоча на макрофагах присутній відомий рецептор МРТ83 – TLR2, зв'язування FITC-міченого МРТ83 із поверхнею перитонеальних макрофагів миші виявити не вдалося. Вірогідно це пояснюється тим, що рівень представленості TLR2 на поверхні макрофагів є невисоким.

Натомість ми виявили зв'язування МРТ83 з поверхнею клітин лінії U2149 (рис. 6).

А



Б

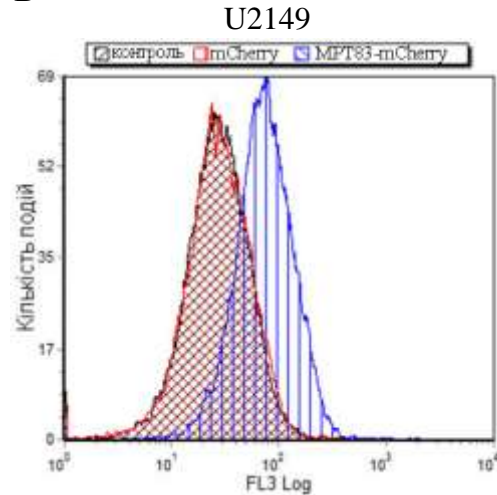


Рис. 6. Конфокальна мікроскопія препаратів клітин лінії U2149, інкубованих з mCherry-МРТ83 та mCherry (А). Гістограма інтенсивності флуоресценції макрофагоподібних клітин U2149, інкубованих з mCherry-МРТ83 та mCherry (Б)

Виявлено зв'язування МРТ63 з невеликою субпопуляцією клітин U937 (рис.7), ймовірно, моноцитарних. Втім, а ні з мишачими перитонеальними макрофагами, а ні з іншими моноцито- та макрофагоподібними клітинами достовірного зв'язування МРТ63 виявити не вдалося.

U937

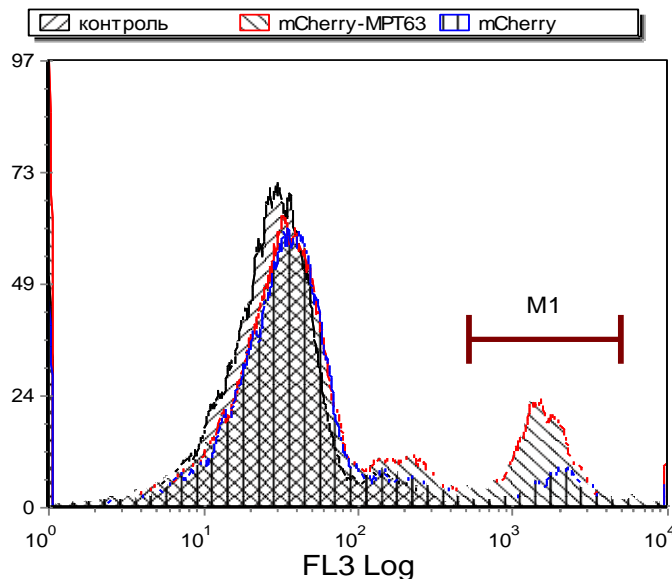


Рис. 7. Гістограма інтенсивності флуоресценції препаратів клітин U937, інкубованих з mCherry-МРТ63 та mCherry

Таким чином, за нашими даними, зафіксовано зв'язування МРТ63 з окремою популяцією клітин селезінки, а також з невеликою субпопуляцією клітин U937; відсутнє зв'язування з клітинами, що є моделлю фібробластів, епітелія чи лімфоцитів, а також моноцито- та макрофагоподібними клітинами. Отже, клітинами-мішенями МРТ63 можуть бути не досліджені нами популяції (дендритні клітини) або макрофаги на певній стадії диференціювання (на користь чого дуже опосередковано свідчить зв'язування з незначною частиною клітин U937). Зв'язування МРТ83 з макрофагами миші не виявлено, але зафіксовано зв'язування МРТ83 з клітинами лінії U2149. Загалом, TLR2 не є єдиною можливою мішенню для МРТ83. Зокрема, у макрофагах мишей-нокаутів за TLR2 при стимуляції МРТ83 спостерігалось суттєве зростання експресії TNF-а, IL-6 та IL-12, хоча й на нижчому рівні, ніж у макрофагах мишей дикого типу [Skerry C. et al., 2016]. Так само блокування анти-TLR2 антитілами знижувало, але не відміняло ефекти МРТ83 [Chen S.T. et al., 2012]. Тому механізми взаємодії МРТ83 з клітинами організму залишаються не до кінця зрозумілими. Встановлений факт активного зв'язування клітин лінії U2149 з МРТ83 робить її дуже привабливою моделлю для досліджень механізмів дії цього антигена мікобактерій.

Вплив МРТ63 та МРТ83 на активацію, дозрівання та фагоцитарну активність макрофагів. Для визначення фагоцитарної активності до перитонеальних макрофагів після попередньої інкубації з МРТ63 та МРТ83 на 30 хв додавали клітини *E.coli*-EGFP (у співвідношенні 1:100). В трьох незалежних експериментах відсоток клітин, що активно фагоцитують після стимуляції МРТ63 та МРТ83 зростав приблизно в два рази: без стимуляції – $10,5 \pm 1,1$ %; передінкубація з mCherry – $10,9 \pm 0,79$ %; передінкубація з МРТ63 – $19,1 \pm 1,62$ %; передінкубація з МРТ83 – $19,8 \pm 2,1$ %. Крім того, достовірних відмінностей при збільшенні тривалості інкубації з 30 хв до 1 год чи 2 год не виявлено. Натомість після інкубації з mCherry відсоток клітин, що активно фагоцитують, зростав не суттєво. На рис. 8 наведено результати фагоцитарного тесту після стимуляції макрофагів МРТ63, МРТ83 та mCherry за умов інкубації з цими протеїнами протягом 3 год.

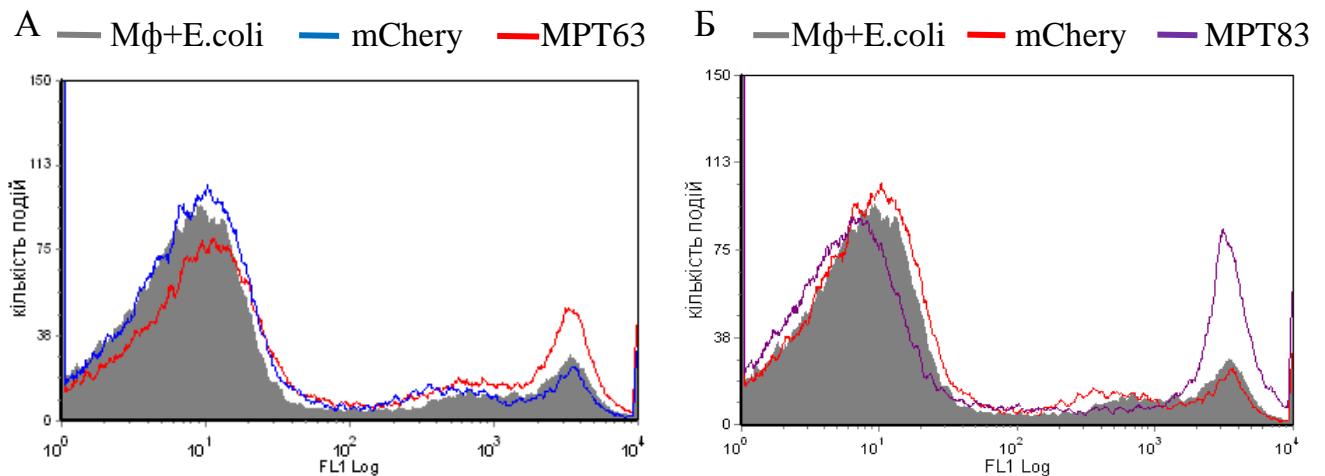


Рис. 8. Гістограма інтенсивності флуоресценції макрофагів (Мф) після фагоцитарного тесту з використанням клітин *E.coli*-EGFP за умов впливу МРТ63 (А) і МРТ83 (Б)

Таким чином, стимуляція МРТ63 та МРТ83, але не контрольним антигеном mCherry, призводила до збільшення кількості перитонеальних макрофагів здатних до активного фагоцитозу. Це може бути пояснено «стратегією» збудника якомога швидше потрапити всередину макрофагів, де він може розмножуватись та виживати, уникаючи елімінуючих клітинних і гуморальних факторів імунітету господаря.

Оскільки результати вивчення взаємодії МРТ63 і МРТ83 із фагоцитарними клітинами показали, що така взаємодія можлива, ми дослідили, як впливатимуть ці антигени на експресію CD11b і F4/80 перитонеальними макрофагами. Було виявлено, що після інкубації з МРТ63 протягом 24 год відсоток клітин з високим рівнем експресії CD11b зростав. Як контрольний антиген використовували mCherry, який був експресований у клітинах *E.coli*, виділений і очищений за тим же протоколом, що дозволяло перевірити можливий вплив ймовірних бактеріальних домішок. У трьох незалежних експериментах показано, що передінкубація з МРТ63 підвищувала відсоток клітин з високим рівнем експресії CD11b, а клітини, що попередньо інкубувались із mCherry, за цим показником мало відрізнялись від інтактних (табл. 1). Зміни в експресії CD11b на поверхні можуть відбуватись вже через декілька хвилин після стимуляції за рахунок його внутрішньоклітинного пулу. Оскільки після стимуляції МРТ63 для зміни рівня представленості CD11b на клітинній мембрані був необхідний час (24 год), вірогідно цей процес обумовлений змінами в експресії гену CD11b.

Аналогічний експеримент було проведено з МРТ83 і отримано принципово подібні результати. Так само як і у випадку МРТ63, при інкубації з МРТ83 протягом 30 хв чи 8 год ефект не спостерігався. Надалі, ми перевірили чи призводить стимуляція МРТ63 та МРТ83 до зростання відсотка клітин з високою експресією F4/80 – маркера зрілих макрофагів. І переконалися, що справді таке зростання має місце (табл. 1).

Таблиця 1

Відносна кількість перитонеальних макрофагів миші, імунопозитивних на CD11b та F4/80, за впливу рекомбінантних антигенів (24 год), %

	інтактні клітини (контроль)	mCherry	МРТ63	МРТ83
CD11b +	31,5±0,95	33,2±1,2	47,5±3,7*#	40,7±1,9*#
F4/80 +	51,7±0,55	52,1±1,1	60,4±1,5*#	59,7±1,15*#

Примітка: *P<0,05 у порівнянні з інтактними клітинами; #P<0,05 у порівнянні із стимульованими mCherry

Тобто, у присутності МРТ63 та МРТ83 відбувається активація макрофагів. У випадку МРТ83 такий ефект є цілком передбачуваним і може бути пояснений стимуляцією через взаємодію з TLR2. З отриманих результатів також випливає, що МРТ63 так само здатен специфічно викликати активацію макрофагів, а, отже, повинен існувати певний специфічний механізм такого його впливу.

Оцінка впливу антигенів *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83 на проліферативну активність клітин імунної системи, сполучної та епітеліальної тканин. Рекombінанти протеїни MPT63 та MPT83 додавали до середовища інкубації клітин лінії J774, A431 та 3T3 та досліджували через 24 год (рис. 9). Одержані результати свідчать про ймовірний цитотоксичний ефект на клітини природного імунітету – макрофаги, але не на клітини лінії 3T3 (рис. 9,А).

На гістограмі рис. 9,Б можна ідентифікувати зсув флуоресценції зв'язування клітин лінії J774 з анексином V-EGFP після впливу антигену *M.tuberculosis* MPT63, що свідчить про ймовірний вихід цієї субпопуляції клітин на шлях апоптозу. Проведено порівняння впливу мікобактеріальних антигенів на відповідні клітини і в проліферативному МТТ-тесті (рис. 9,А). Показано відсутність цитотоксичного та проапоптичного впливів MPT63 та MPT83 (до 10 мкМ) на клітини лінії 3T3, проте на макрофагальних клітинах лінії J774 показано цитотоксичний/цитостатичний (32-42%) та апоптичний (5-12%) ефект мікобактеріальних антигенів.

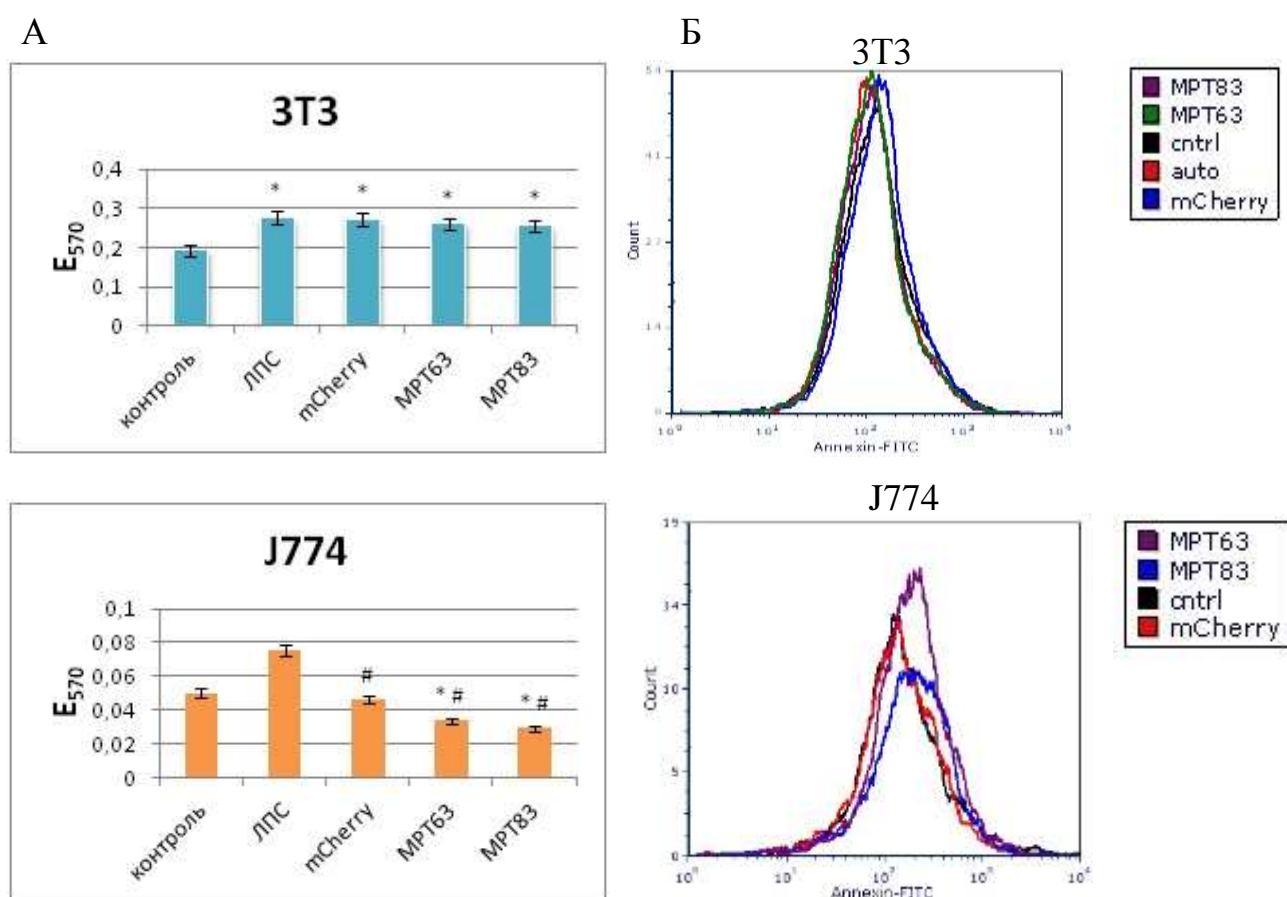


Рис. 9. Проліферативна активність (МТТ-тест) клітин ліній 3Т3 та J774 за впливу рекombінантних антигенів MPT63, MPT83 і ЛПС (А). Гістограма інтенсивності флуоресценції клітинних препаратів 3Т3 та J774 після стимуляції MPT63 і MPT83, забарвлення анексином V-EGFP (Б). * $P < 0,05$ у порівнянні з контролем; # $P < 0,05$ у порівнянні із стимульованими ЛПС

Активність матриксних металопротеїназ у кондиційованому середовищі J774 після стимуляції MPT63 та MPT83. Ензими сімейства матриксних

металопротеїназ (ММП) відіграють важливу роль у багатьох процесах за норми та патології, в тому числі і в такій імунній реакції як формування гранульоми, зокрема при туберкульозі [Leber T.M. et al., 1997; Taylor J.L. et al., 2006]. За нашими даними довготривала інкубація клітин із МРТ63 та МРТ83 (0,25 та 1,5 мкМ) супроводжувалась посиленням желатиназної активності ферментів у середовищі культури клітин J774 (рис. 10.). Не виявлено різниці між зростанням активності ММП-9 після попередньої інкубації з МРТ63 у концентрації 0,25 та 1,5 мкМ. Разом з тим, лише після інкубації з 0,25 мкМ МРТ83, а не з 1,5 мкМ відбулось підвищення желатиназної активності.

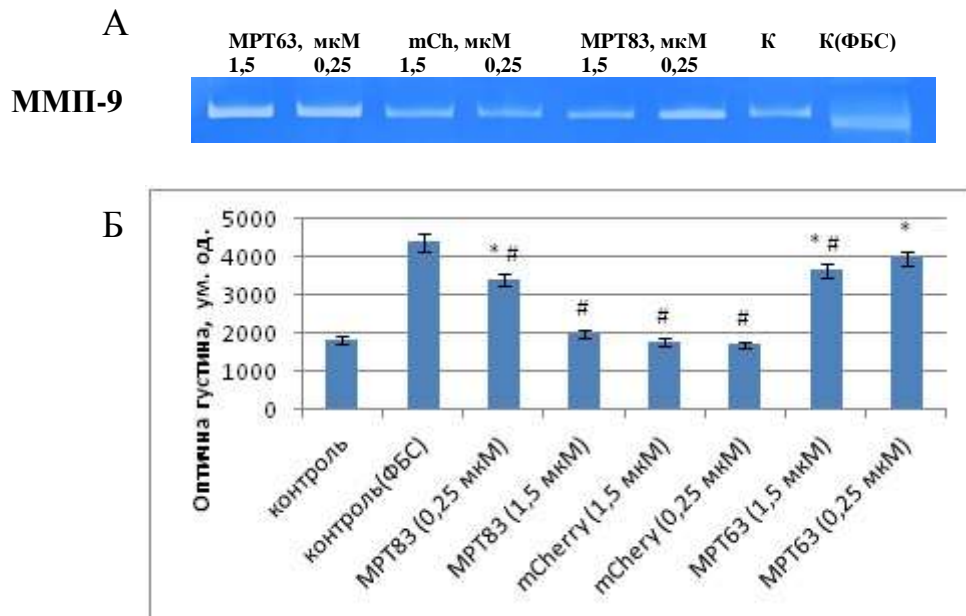


Рис. 10. Ензим-електрофореграма зразків кондиційованого середовища клітин лінії J774 стимульованих МРТ63, МРТ83 та mCherry (А). Відносний вміст ММП-9 у кондиційованому середовищі за умов впливу рекомбінантних антигенів. Контроль – нестимульовані клітини J774 без ФБС; контроль(ФБС) – нестимульовані клітини J774, середовище містило 10% ФБС. * $P \leq 0,05$ у порівнянні з контролем; # $P \leq 0,05$ у порівнянні з контролем(ФБС) (Б)

Відомо, що при розвитку інфекції у мишей спостерігається посилена експресія ММП, тому ми припустили, що антигени МРТ63 та МРТ83 можуть брати опосередковану участь у видозміні показклітинного матриксу при формуванні гранулом при туберкульозній інфекції.

Розробка прототипів діагностичних тест-систем для визначення рівнів антитіл до *M.bovis/M.tuberculosis* у сироватках крові великої рогатої худоби та людини. Використовуючи раніше отриманий химерний протеїн на основі фасциклінподібного домену МРТ83 (МРТ83(FLD₁₁₅₋₂₂₀)-МРТ63) [Redchuk T.A. et al., 2010] та новостворену антигенну субстанцію на основі повнорозмірного МРТ83, було розроблено та протестовано дві імуноензимні тест-системи, які дозволяють визначати наявність антитіл до збудника у сироватці крові ВРХ та людини.

Розроблені нами діагностичні тест-системи ґрунтуються на принципі непрямого ІЕА та здатні визначати антитіла до *M.bovis/M.tuberculosis* завдяки унікальному імуносорбенту на основі МРТ63 та МРТ83. Нами доведено, що тест-система «ІВ-Chem Anti-Mycobacterium bovis» є ефективною для діагностики саме інфікованих *M.bovis* тварин (рис. 12). Крім того, зразки сироваток корів, які були заражені іншими видами *Mycobacterium*, а саме *M.intracellulare*, *M.fortuitum*, *M.avium*, *M.kansasii* та *M.paratuberculosis* не давали позитивного сигналу при ІЕА та були визначені за формулою «індексу позитивності» (ІП) як негативні.

Відомі реакції гіперчутливості сповільненого типу у корів на туберкулін для птахів [Goodchild A.V. et al., 2015] підтверджують раціональність використання серологічних методів на основі ІЕА для спростування хибнопозитивних реакцій. Хибнопозитивні результати шкіряної проби, які виникають внаслідок інфікування атиповими мікобактеріями, негативно впливають на економічне становище фермерських господарств.

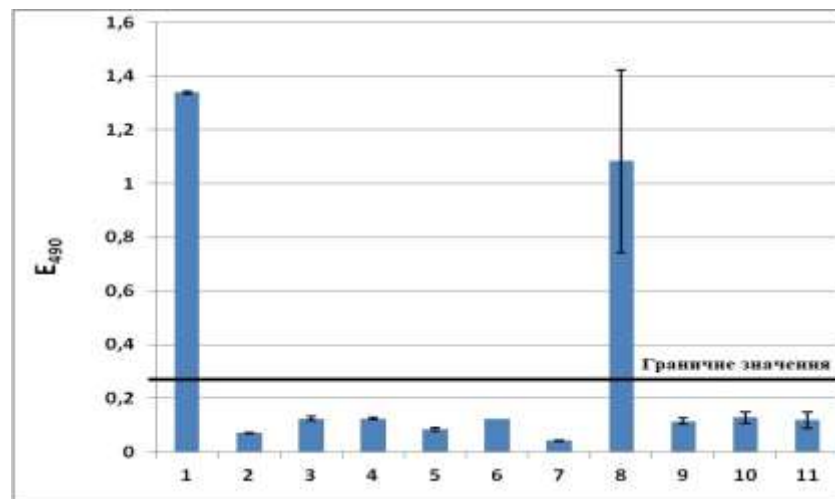


Рис. 12. Рівень IgG до цільового антигену МРТ63-МРТ83(115-220): 1 – позитивний контроль; 2 – негативний контроль; 3 – *M.intracellulare*-інфіковані; 4 – *M.fortuitum*-інфіковані; 5 – *M.avium*-інфіковані; 6 – *M.kansasii*-інфіковані; 7 – *M.paratuberculosis*-інфіковані; 8 – *M.bovis*-інфіковані; 9 – негативно реагуючі на туберкулін і реакцію імунодифузії (РІД); 10 – позитивно реагуючі на туберкулін для птиці (діагноз туберкульоз не підтверджений); 11 – РІД-позитивні тварини

Примітка: Рівень граничного значення розраховували згідно інструкцій виробника. Показник для інтерпретації результатів створеної тест-системи

На першому етапі впровадження запропонованої тест-системи в практику ветеринарного моніторингу епізоотичної ситуації з туберкульозу можна очікувати, що ІЕА буде методом підтвердження або спростування діагнозу, встановленого за допомогою алергічної проби з туберкуліном. Оскільки в сучасних господарствах значна частина тварин може бути сенсibiliзована атиповими мікобактеріями, існує необхідність диференціації алергічних та параалергічних реакцій на туберкулін.

Діагностичну чутливість та специфічність розробленої нами тест-системи для діагностики туберкульозу у людини «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*» розраховували за загальноприйнятими формулами для серологічних тестів на основі ІЕА:

$$\text{Специфічність} = (Н / (Н + ХП)) \times 100\%,$$

де Н – кількість негативних результатів, ХП – кількість хибнопозитивних результатів.

$$\text{Чутливість} = (П / (П + ХН)) \times 100\%,$$

де П – кількість позитивних результатів, ХН – кількість хибнонегативних результатів.

Згідно з результатами ІЕА дослідної тест-системи на основі рекомбінантного химерного протеїну *M.tuberculosis* МРТ83-МРТ63 (рис. 13) специфічність аналізу склала 95,5%, а чутливість – майже 70% (рис. 13).

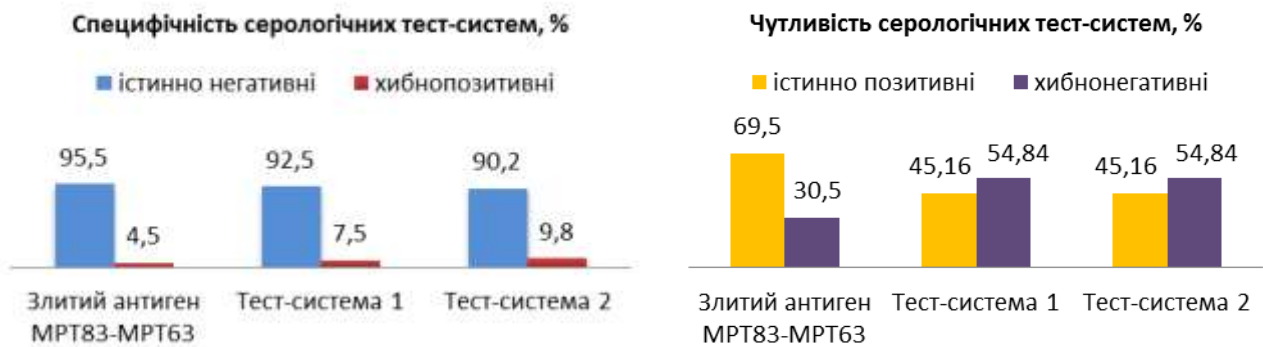


Рис. 13. Порівняльна характеристика специфічності та діагностичної чутливості дослідної тест-системи на основі рекомбінантного злитого протеїну МРТ83-МРТ63 та референтних тест-систем для діагностики туберкульозу легень у людей

У порівнянні з одержаними показниками чутливості та специфічності комерційних тест-систем (тест-система 1, тест-система 2), що існують на ринку України, запропонована нами тест-система «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*» характеризується не гіршими показниками інформативності серологічних тестів, а в деяких випадках і перевершує їх.

ВИСНОВКИ

Виявлена в дисертаційній роботі здатність рекомбінантних протеїнів *M.tuberculosis complex* МРТ63 та МРТ83 впливати на процеси фагоцитозу, активації та дозрівання макрофагів, індукувати апоптоз фагоцитів, посилювати активність ензимів, що ремодулюють позаклітинний матрикс, характеризує патогенетичну роль цих антигенів у розвитку мікобактеріальної інфекції. Висока імуногенність та

обмежена представленість у протеомах інших мікобактерій дозволяє використовувати ці протеїни для діагностики туберкульозу.

1. Отримано генетичні конструкції, що кодують рекомбінантні аналоги антигенів *M.tuberculosis* MPT63 і MPT83 та їх флуоресцентні похідні. Охарактеризовано рекомбінантні антигени *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83; оптимізовано умови їх виділення та очищення.
2. Показано, що MPT63 зв'язується з окремою популяцією (10% від загального пулу) клітин селезінки миші. При дослідженні клітинних ліній, що репрезентують фенотипи епітеліоцитів, фібробластів, лімфоцитів, макрофаго- та моноцитоподібних клітин виявлено, що MPT63 специфічно зв'язується з невеликою (5% від загального пулу) субпопуляцією високогранулярних клітин лінії гістіоцитарної лімфоми людини U937, і не зв'язується з клітинами інших ліній. Методами імунохімії показано, що антиген мікобактерій MPT83 зв'язується з поверхнею макрофагоподібних клітин лінії U2149.
3. Встановлено, що 24-год інкубація з MPT83 та MPT63 індукує активацію макрофагів: збільшує кількість клітин з високим рівнем експресії активаційних маркерів CD11b та F4/80 та посилює фагоцитоз.
4. Показано відсутність цитотоксичного та проапоптичного впливів MPT63 та MPT83 (до 10 мкМ) на клітини ліній U937, A431 та 3T3. На макрофагальних клітинах лінії J774 виявлено цитотоксичний/цитостатичний (32-42%) і апоптичний (5-12%) ефект MPT63 та MPT83 та посилення активності ММП у кондиційованому середовищі J774. Встановлено, що за інкубації з рекомбінантним MPT63 в ядрах клітин J774 знижуються рівні р65 субодиниці NF-κB вже з 20 хв.
5. Розроблено прототипи тест-систем для визначення антитіл проти антигенів збудників туберкульозу людини («IB-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*») і тварин («IB-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*»). Доведено, що тест-система «IB-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*» перевершує референтні за критеріями діагностичної чутливості та специфічності.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. Siromolot AA, Oliinyk OS, Kolibo DV, Komisarenko SV. *Mycobacterium tuberculosis* antigens MPT63 and MPT83 increase phagocytic activity of murine peritoneal macrophages. *Ukr. Biochem. J.* 2016 Sep-Oct;88(5):62-70. (Особистий внесок здобувача: одержання рекомбінантного MPT83, проведення тесту на фагоцитоз, отримання первинної культури перитонеальних макрофагів миші, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису).

2. Siromolot AA, Redchuk TA, Solodiankin OS, Kolibo DV, Gerilovich AP, Komisarenko SV. The trial of experimental test system for the specific diagnostics of cattle tuberculosis. *Biotechnol Acta.* 2016 Jul-Aug;9(4):14-8. (Особистий внесок здобувача: тестування сироваток крові інфікованих різними штамами мікобактерій корів на діагностичній тест-системі, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису).

3. Siromolot AA, Oliinyk OS, Kolibo DV, Gerilovych AP. Improvement and optimization of antigenic composition for serodiagnosis of tuberculosis. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2016;2(4):11-5. (Особистий внесок здобувача: одержання химерного протеїну MPT83-MPT63, перевірка антигенності одержаної субстанції, обробка та узагальнення результатів).

4. Siromolot AA, Kolibo DV. Putative target cells for *Mycobacterium tuberculosis* antigens MPT63 and MPT83. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2018;9(2):367-378.

5. Siromolot AA, Oliinyk OS, Kolybo DV. Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* antigens MPT63 and MPT83 by murine polyclonal and scFv antibodies. *Biotechnol Acta*. 2018;11(2):42-51. (Особистий внесок здобувача: виділення та очищення рекомбінантних антигенів, імунізація лабораторних тварин, тестування сироваток крові на антигенах за допомогою ІЕА, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису).

Тези наукових доповідей

1. Siromolot AA, Oliinyk OS, Kolibo DV. Role of *Mycobacterium tuberculosis* MPT63 and MPT83 antigens in mechanism of immune cells activation in vitro. Proceedings of the 2nd Prague European Days of Internal Medicine; 2016 Dec 1-2; Prague, Czech Republic. 2016, P 75.

2. Siromolot AA, Kolibo DV. Chimeric protein of *Mycobacterium tuberculosis* complex antigens MPT63 and MPT83 as a prospective tool for TB diagnostics based on ELISA. Proceedings of the International Medical Students' Conference PHOENIX 2017; 2017 Mar 22-26; Mangalore, India. 2017, P 30.

3. Сіромолот АА, Колибо ДВ. Одержання та тестування антигенної композиції протеїнів *Mycobacterium tuberculosis* MPT63 та MPT83 для серодіагностики туберкульозу. В: Всеукраїнський медичний журнал молодих вчених «Хист»; Матеріали IV Міжнародного медико-фармацевтичного конгресу студентів і молодих вчених «Інновації та перспективи сучасної медицини»; 2017 квіт. 5-7; Чернівці, Україна. 2017, стр 236.

4. Siromolot AA, Kolibo DV. Recombinant antigen of *Mycobacterium tuberculosis* MPT83(full)-MPT63 – prospective candidate for screening of tuberculosis in humans. Матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії»; 2017 квіт. 26-28; Запоріжжя, Україна. 2017, стр. 191-2.

5. Siromolot AA, Kolibo DV. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* antigens recognition by mouse serum immunoglobulins to pathogen components. Матеріали XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»; 2017 квіт 25-27; Львів, Україна. 2017, стр. 217-8.

6. Siromolot AA, Kolibo DV. Development of efficient recombinant antigenic substance for tuberculosis diagnostics. Proceedings of the 9th EFIS-EJI South Eastern Europe Immunology Scholl (SEEIS2017); 2017 Sep 8-11; Lviv, Ukraine. 2017, P 25.

7. Siromolot AA, Kolybo DV. Recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* MPT63 and MPT83 increase phagocytosis efficiency, activation and maturation of macrophages. Proceedings of the 14th Horizons in Molecular Biology; 2017 Sep 11-14; Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Goettingen, Germany. 2017, P 72.

8. Siromolot AA, Kolybo DV. Immunobiological and biochemical properties of *Mycobacterium tuberculosis* antigens MPT63 and MPT83. Proceedings of the III international scientific conference «Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century»; 2018 Apr 19-20; Kyiv, Ukraine. 2018, P 161-2.

Патенти на корисну модель

1. Комісаренко СВ, Колибо ДВ, Олійник ОС, Редчук ТА, Луговська НЕ, Сіромолот АА, Стегній БТ, Герілович АП, Завгородній АІ, Ніколаєнко ІВ, Раєвська ГЄ, винахідники; Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, патентовласник. Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до *Mycobacterium bovis*. Патент України № 100065. 2015 жовт. 07.

2. Комісаренко СВ, Колибо ДВ, Редчук ТА, Олійник ОС, Галкін ОЮ, Романюк СІ, Сіромолот АА, Луговська НЕ, Фещенко ЮІ, Рекалова ОМ, Чудіна ТО, винахідники; Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, патентовласник. Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до *Mycobacterium tuberculosis*. Патент України № 118447. 2017 лип. 10.

АНОТАЦІЯ

Сіромолот А.А. Імунобіологічні властивості антигенів *Mycobacterium spp.* МРТ63 та МРТ83 та їх роль у діагностиці туберкульозу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України, Київ, 2018.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню імунобіологічних властивостей антигенів *M.tuberculosis complex* МРТ63 та МРТ83, пошуку їх клітин-мішеней та можливості використання цих протеїнів для діагностики туберкульозу великої рогатої худоби та людини. В роботі створено прокаріотичні штами-продуценти рекомбінантних аналогів флуоресцентних похідних МРТ63 і МРТ83 та удосконалено генетичну конструкцію, що кодує химерний протеїн МРТ83- МРТ63 в одній рамці зчитування. Вперше виявлено потенційні клітини-мішені імунодомінантних антигенів *Mycobacterium spp.* МРТ63 та МРТ83. Встановлено здатність МРТ63 та МРТ83 сприяти активації та дозріванню макрофагів через експресію маркерів CD11b та F4/80, посилювати їх фагоцитарну активність.

Розроблена тест-система «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*» є ефективною для діагностики саме інфікованих *M.bovis* тварин. Сконструйований в роботі злитий антиген МРТ83-МРТ63 використано як імуносорбент для створення імуноензимної тест-системи «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*» для скринінгу сироваток крові хворих на туберкульоз легень пацієнтів, що перевершує референтні комерційно доступні тест-системи за критеріями специфічності та діагностичної чутливості

Ключові слова: туберкульоз, антигени, *Mycobacterium tuberculosis*, рекомбінантні протеїни, МРТ63, МРТ83, макрофаги, фагоцитоз, активація, діагностика, тест-система.

АННОТАЦИЯ

Сиромолот А.А. Иммунобиологические свойства антигенов *Mycobacterium spp.* МРТ63 и МРТ83 и их роль в диагностике туберкулеза. - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 - иммунология. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко Министерства образования и науки Украины, Киев, 2018.

Диссертационная работа посвящена исследованию иммунобиологических свойств антигенов *M.tuberculosis complex* МРТ63 и МРТ83, поиска их клеток-мишеней и возможности использования этих протеинов для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота и человека. В ходе работы созданы прокариотические штаммы-продуценты рекомбинантных аналогов флуоресцентных производных МРТ63 и МРТ83 и усовершенствована генетическая конструкция, кодирующая химерный протеин МРТ83-МРТ63 в одной рамке считывания. Впервые обнаружены потенциальные клетки-мишени иммунодоминантных антигенов *Mycobacterium spp.* МРТ63 и МРТ83. Установлено, что МРТ63 и МРТ83 способствует активации и созреванию макрофагов через экспрессию маркеров CD11b и F4/80, усилению их фагоцитарной активности.

Разработанная тест-система «IB-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*» является эффективной для диагностики именно инфицированных *M.bovis* животных. Сконструированный в работе слитый антиген МРТ83-МРТ63 использован как иммуносорбент для создания иммуноэнзимной тест-системы «IB-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*» для скрининга сывороток крови больных туберкулезом легких пациентов, что превосходит референтные коммерчески доступные тест-системы относительно критериев специфичности и диагностической чувствительности.

Ключевые слова: туберкулез, антигены, *Mycobacterium tuberculosis*, рекомбинантного протеины, МРТ63, МРТ83, макрофаги, фагоцитоз, активация, диагностика, тест-система.

SUMMARY

Siromolot A.A. Immunobiological properties of *Mycobacterium spp.* antigens МРТ63 and МРТ83 and their role in tuberculosis diagnostic. – Qualification scientific work on the rights of manuscripts.

The thesis for candidate of biological sciences degree in major 03.00.09 – immunology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

Knowledge about mechanisms of pathogenesis and development of tuberculosis (TB) is rapidly growing. Interactions of bacterial pathogenic factors with target molecules lead to particular effects in host. Thus, investigation of features and functions of number tuberculosis bacilli antigens is a prerequisite for prevention and treatment of TB.

This work is dedicated to investigation of immunobiological properties of MPT63 and MPT83, target cells searching and the possibility of using these proteins for the diagnosis of bovine and human TB.

In order to create the molecular instruments necessary for the search of antigens targets with immunochemistry methods and for development of diagnostic test-system fluorescent derivatives of MPT63 and MPT83 and fusion antigenic substance MPT83-MPT63 in one open reading frame were obtained in prokaryotic expression system *E.coli*.

For the first time, putative target cells for the immunodominant antigens *Mycobacterium spp.* MPT63 and MPT83 were detected. The ability of MPT63 and MPT83 to promote activation and maturation of macrophages by expression of CD11b and F4/80 markers has been established.

Also, we demonstrate that the humoral immune response to MPT63, MPT83, MPT83-MPT63 fusion protein and equimolar set of MPT63 and MPT83 is highly distinguished. For each antigen, serum antibody levels were evaluated by using a cutoff value based on optical density index. It has been proven a crucial role of MPT83 for immunogenicity of chimeric protein and/or cocktail of individual antigens under conditions of immunization of laboratory animals. We obtained specific scFv antibodies against MPT63 and MPT83, which could be used for development of the system for quantitative determination of antigens as well as for investigation their biological properties.

According to the results of the study, it was shown that test-system «IB-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*» is effective in diagnostics in animals infected with *M. bovis* proper.

An industrial sample of a test-system for serological diagnosis of human tuberculosis was developed. The comparative characteristic of the experimental test-system with reference diagnostic tools is carried out. The specificity of the MPT83-MPT63 based test-system was 69.5% compared to 45.2% for the reference test systems #1 and #2, and the sensitivity was 95.5% compared with 92.5% and 90.2% for test-systems #1 and #2 respectively.

Classic BCG vaccine has been used worldwide to prevent TB disease in infants and children, but it has demonstrated limited and variable effectiveness in preventing pulmonary TB in adolescents and adults. The use of alternative antigens and additional approaches for vaccine development urgently needed to protect against TB. Nevertheless, our results establish a novel platform for development of antigenic substances with inherent immunogenic characteristics that are desirable in vaccines.

Key words: tuberculosis, antigens, *Mycobacterium tuberculosis*, recombinant proteins, MPT63, MPT83, macrophages, phagocytosis, activation, diagnostics, test-system.

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

ВРХ	велика рогата худоба
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ІЕА	імуноензимний аналіз
ММП	матриксна металопротеїназа
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
РІД	реакція імунодифузії
ФБС	фетальна бичача сироватка
BCG	<i>(Bacillus Calmette-Guérin)</i> вакцинний штам <i>Mycobacterium bovis</i>
BSA	<i>(bovine serum albumin)</i> бичачий сироватковий альбумін
EGFP	<i>(yielding enhanced GFP)</i> зелений флуоресцентний протеїн
FITC	<i>(fluorescein isothiocyanate)</i> флуоресцеїн ізотіоціанат
IFN	<i>(interferon)</i> інтерферон
IL	<i>(interleukin)</i> інтерлейкін
IPTG	<i>(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)</i> ізопропіл-β-D-тіогалактозид
МАРК	<i>(mitogen-activated protein kinases)</i> протеїнкінази, що активуються мітогенами
TLR	<i>(Toll like receptor)</i> Toll-подібні рецептори
TNF	<i>(tumor necrosis factor)</i> фактор некрозу пухлин